

Charakterisierung der NLRP3-abhängigen und -unabhängigen IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Judith Bockstiegel

aus

Speyer

Bonn, November 2023

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Günther Weindl
2. Gutachter: Prof. Dr. Finn Hansen

Tag der Prüfung: 16.04.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anregung und Anleitung von Prof. Dr. Günther Weindl von April 2018 bis Februar 2023 in der Pharmakologie und Toxikologie des Instituts für Pharmazie der Freien Universität Berlin sowie in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn angefertigt.

Ein Teil dieser Arbeit wurde bereits an folgenden Stellen publiziert:

Judith Bockstiegel, Jonas Engelhardt, Günther Weindl. P2X7 receptor activation leads to NLRP3-independent IL-1 β release by human macrophages. Cell Commun Signal. Akzeptiert.

doi: 10.1186/s12964-023-01356-1

In dieser Arbeit miteinbezogen: **Komplette Publikation.**

Judith Bockstiegel, Silas L. Wurnig, Jonas Engelhardt, Jana Enns, Finn K. Hansen, Günther Weindl. Pharmacological inhibition of HDAC6 suppresses NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β release. Biochem Pharmacol. 2023; 215:115693

doi: 10.1016/j.bcp.2023.115693

In diese Arbeit miteinbezogen: **Komplette Publikation mit Ausnahme S. 7, Abbildung 5 (C und D); S. 8, Abbildung 6.**

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

In erster Linie gilt mein Dank meinem Doktorvater und wissenschaftlichen Betreuer dieser Arbeit Prof. Dr. Günther Weindl. Lieber Günther, ich danke Dir für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in Deinem Arbeitskreis anzufertigen und mit Dir zusammen an diesen interessanten Projekten zu arbeiten. Deine hervorragende Betreuung während der gesamten Zeit hat die Zusammenarbeit für mich zu einer bereichernden Erfahrung gemacht. Ich schätze es besonders, dass Du eine Arbeitsatmosphäre schaffst, die eigenverantwortliche und selbstbestimmte Arbeit fördert, gleichzeitig jedoch stets auf Dein umfassendes Fachwissen zurückgegriffen werden kann. Deine kontinuierliche Unterstützung hat maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen. Ebenso möchte ich mich für die unvergesslichen Momente bedanken, die wir als Arbeitskreis gemeinsam erlebt haben. Ob Karneval, Karaoke oder Phantasialand – der Spaß außerhalb des Labors hat nicht nur zu einer positiven Arbeitsatmosphäre, sondern auch zu einem starken Gruppenzusammenhalt beigetragen. Ich werde diese Zeit in schöner Erinnerung behalten.

Bei Prof. Dr. Finn Hansen möchte ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken. Außerdem danke ich Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Prof. Dr. Thomas Bartolomaeus für die Mitwirkung in meiner Prüfungskommission.

Ich danke der Graduiertenschule BIGSDrugS für die Finanzierung meiner Teilnahme an der „Novel Concepts in Innate Immunity 2019“ und der „6th German Pharm-Tox Summit 2021“. Insbesondere möchte ich mich an dieser Stelle auch bei der Koordinatorin Dorothee Müssemeier für ihr Engagement bei der Organisation der Vorträge, sowie der sozialen Events bedanken.

Eine solche Arbeit kann nur durch die Unterstützung von Kolleginnen und Kollegen gelingen. Deshalb gilt ein besonderer Dank auch allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe Weindl für die wundervolle Zeit, in der gegenseitige Unterstützung eine Selbstverständlichkeit war. Danke, für die gute Laune am Arbeitsplatz, für eure unterstützenden Worte in herausfordernden Situationen, die gemeinsamen Mittagspausen und unsere schöne Zeit neben der Arbeit. Besonders möchte ich meinen BürokollegInnen Jonas Engelhardt und Dr. Charlotte Lübow danken. Lieber Jonas, Du kamst genau zur richtigen Zeit in unseren Arbeitskreis. Deine Begeisterung für Forschung hat mir zu neuem Schwung verholfen und einen wesentlichen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen. Die Zusammenarbeit mit Dir an unserem gemeinsamen Projekt war ein Highlight meiner Promotionszeit. Danke, für Deinen Zuspruch, deinen Rat und die Hilfe, auf die ich immer zählen konnte. Liebe Charlotte, ich bin so dankbar, dass Du mit mir das Projekt „Bonn Voyage“ angegangen bist. Ich kann mir nicht vorstellen, was ich ohne Dich gemacht hätte. Ohne Dich wäre die gesamte Zeit nur halb so schön und die legendäre Weihnachtsfeier nur halb so lustig gewesen. Danke, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest, mich in jeder Lebenslage unterstützt hast und Dir die Zeit für das Korrekturlesen dieser Arbeit genommen hast.

Danke auch an alle lieben Menschen, die Teil meiner Zeit an der FU Berlin waren. Besonders danke ich Dr. Maria Grabowski, durch die ich zu Beginn meiner Promotionszeit viel lernen konnte, und Dr. Anne Eichhorst, für den grenzenlosen Optimismus, der mich mehr stets motiviert und den ich in meinem Leben nicht missen möchte.

Ein großer Dank gilt außerdem meinen Freundinnen und Freunden, die mich in den vergangenen Jahren mit ihrem Rückhalt an meiner Seite. Viele von ihnen begleiten mich schon seit Beginn meines Studiums. Außerdem brachte der Wechsel von Berlin nach Bonn während meiner Promotionszeit viele neue Freundschaften mit sich. Danke an meine Köln-Crew, dass ihr Köln zu einem Zuhause für mich gemacht habt und danke an meinen Berliner FreundInnenkreis, dass ihr mir das Gefühl gebt, auch weiterhin ein Zuhause bei euch zu haben. Ich bin dankbar, dass ihr mich durch alle Höhen und Tiefen begleitet. Es ist schön, das Leben mit euch gemeinsam zu bestreiten. Ein spezielles Dankeschön richte ich an Dr. Dominik Wigger und Sören Hornof für ihr gewissenhaftes Korrekturlesen meiner Arbeit sowie an Anica Luggen-Hölscher und Lea Heuer für ihre anhaltende Motivation und gute Laune während der intensiven Schreibphase in der Bibliothek.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich auf meinem Weg bis hier begleitet hat und auf die ich mich immer verlassen kann. Sie hat mir mein Pharmaziestudium ermöglicht und mich in allen Lebenslagen stets ermutigt und unterstützt. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr immer an mich glaubt. Ich bin froh, dass es euch gibt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Interleukin-1 β	2
1.1.1 Generierung von Interleukin-1 β über das NLRP3-Inflammasom.....	3
1.1.1.1 Priming.....	4
1.1.1.2 NLRP3-Inflammasom-Aktivierung.....	4
1.1.1.3 Aktivierung und Funktion der Caspase-1.....	7
1.1.1.4 Caspase-1-abhängige Gasdermin D Porenbildung führt zur Freisetzung von reifem IL-1 β und Pyroptose	8
1.1.2 Generierung von IL-1 β durch nicht-kanonische-Inflammasome	9
1.2 Purinerge P2X- und P2Y-Rezeptoren	10
1.2.1 P2X7-Rezeptor	11
1.3 Adenosintetraphosphat.....	11
1.4 Histondeacetylasen	14
1.4.1 HDAC6.....	14
1.4.2 Die Rolle von HDAC6 bei Entzündungsprozessen.....	15
1.5 PROTACs.....	17
1.5.1 PROTAC-vermittelter HDAC6-Abbau	20
1.6 Zielsetzung	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Material.....	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Software.....	25
2.1.3 Plastik- und Glaswaren und Verbrauchsmaterialien.....	26
2.1.4 Oligonukleotide	27
2.1.5 Zelllinien.....	28
2.1.6 Reagenzien.....	28
2.1.7 Verwendete Lösungen.....	33
2.1.7.1 Lösungen zur Zellkultivierung	33
2.1.7.2 Lösungen für den Mykoplasmentest.....	38

2.1.7.3	Stocklösungen für Stimulationsversuche	39
2.1.7.4	Lösungen für den SEAP-Reporter-Test	41
2.1.7.5	Lösungen für die Durchflusszytometrie	42
2.1.7.6	Lösungen für Zellviabilitätstests	42
2.1.7.7	Lösungen für die ELISA Analytik	43
2.1.7.8	Lösungen für die Western Blot Analytik	44
2.1.7.9	Lösungen für PCR-Analytik	50
2.1.7.10	Lösungen für den Calciumflux-Test	50
2.2	Zellkultur	51
2.2.1	Beschichtung der Zellkulturplatten mit Polylysin	52
2.2.2	THP-1 Monozyten und Makrophagen	52
2.2.2.1	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von THP-1 Monozyten	52
2.2.2.2	Differenzierung von THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen	53
2.2.3	THP-1 KO NLRP3 Monozyten und Makrophagen	54
2.2.3.1	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von THP-1 KO Makrophagen	54
2.2.3.2	Differenzierung von THP-1 KO NLRP3 Monozyten zu Makrophagen	54
2.2.4	U937 Monozyten und Makrophagen	55
2.2.4.1	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der U937 Monozyten	55
2.2.4.2	Differenzierung von U937 Monozyten zu U937 Makrophagen	55
2.2.5	Periphere, mononukleäre Blutzellen aus Humanblut	55
2.2.5.1	Isolation von peripheren, mononukleären Blutzellen aus Buffycoat-Blut	56
2.2.6	HEK293 Zellen	57
2.2.6.1	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der HEK293 Zellen	57
2.2.6.2	Transfektion der HEK293 Zellen mit hP2X7-Rezeptor	58
2.2.7	HEK Blue IL-1 β Zellen	59
2.2.7.1	Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von HEK Blue IL-1 β Zellen	59
2.2.7.2	Einsäen der HEK Blue IL-1 β für Testung der Überstände zuvor aktivierter Zellen auf bioaktives IL-1 β	60
2.2.8	Mykoplasmentest	60
2.3	Zellstimulation und Einsatz von Inhibitoren	63
2.3.1	Zellstimulation und Einsatz von Inhibitoren	63
2.4	Methoden zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung	65
2.4.1	SEAP-Reporter-Test	65
2.4.2	Durchflusszytometrie	66
2.4.2.1	Probenvorbereitung	67
2.4.2.2	Bestimmung der Oberflächenmarker-Expression	68

2.4.2.3	YO-PRO-Färbung	69
2.4.2.4	Multiplex Assay	71
2.4.3	Zellviabilitätsuntersuchungen.....	73
2.4.3.1	Annexin V-FITC/Zombie Aqua-Test.....	73
2.4.3.2	Trypan-Blau Färbung	74
2.4.3.3	MTT-Test	75
2.4.3.4	LDH-Test.....	76
2.4.4	ELISA-Analytik	76
2.4.5	Western Blot Analytik.....	78
2.4.5.1	Probenvorbereitung	78
2.4.5.2	Bestimmung der Proteinmenge	79
2.4.5.3	SDS-PAGE (Gelelektrophorese).....	80
2.4.5.4	Proteintransfer	80
2.4.6	PCR-Analytik.....	81
2.4.6.1	RNA-Isolation.....	82
2.4.6.2	cDNA-Synthese	83
2.4.6.3	qPCR	83
2.4.1	RNA-Sequenzierung	84
2.4.2	Calcium Assay	86
2.5	Statistik.....	88
3.	Ergebnisse	89
3.1	Untersuchung der P2X7-Rezeptor-vermittelten IL-1 β -Freisetzung	90
3.1.1	IL-1 β -Freisetzung in PBMCs.....	90
3.1.1	IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Zellen.....	91
3.1.2	Die P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Sekretion ist weitgehend NLRP3-unabhängig	93
3.1.3	Die durch den P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Sekretion ist teilweise Caspase-unabhängig.....	98
3.1.3.1	Der Einfluss von Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen an der P2X7- vermittelten IL-1 β -Freisetzung	99
3.1.3.2	Zusammenhang des K ⁺ -Effluxes und der Serinproteasen mit der Caspase- abhängigen IL-1 β -Freisetzung.....	101
3.1.4	Priming mit verschiedenen TLR-Liganden beeinflusst die Signaltransduktion der P2X7-vermittelten IL-1 β -Freisetzung	103
3.2	Auswirkungen von Ap4 auf Zellen des angeborenen Immunsystems.....	107

3.2.1	Ap4 induziert in angeborenen Immunzellen die Freisetzung von IL-1 β	107
3.2.2	Einfluss von P2X-Rezeptoren auf die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung.....	112
3.2.3	Einfluss von Ap4 auf Purinrezeptoren.....	114
3.2.4	Effekte von Ap4 am P2X7-Rezeptor.....	116
3.2.5	Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig vom K ⁺ Ausstrom und dem NLRP3-Inflammasom.....	121
3.2.6	Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig von Caspasen.....	123
3.2.7	Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig von Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen.....	125
3.2.8	Untersuchung der IL-1 β -Freisetzung in U937 Makrophagen.....	126
3.2.8.1	Ap4 vermittelt eine NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung in U937 Makrophagen.....	130
3.2.9	Ap4, aber nicht ATP, induziert die Expression von Metallothioneinen	132
3.3	Einfluss von HDAC6 auf NLRP3-vermittelte Entzündungsreaktionen.....	135
3.3.1	PROTAC LS-91 führt zum Abbau von HDAC6 in Makrophagen, ohne die Viabilität zu beeinträchtigen.....	135
3.3.2	PROTAC LS-91 und Kontrollsubstanz SLW118 senken die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung.....	140
3.3.3	HDAC-Inhibitoren reduzieren die Freisetzung von IL-1 β	143
4.	Diskussion	147
4.1	Die THP-1 und U937 Zelllinie als Modell für Untersuchungen der IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen	148
4.2	Die IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen kann NLRP3-unabhängig erfolgen.....	149
4.2.1	P2X7-Rezeptorstimulation führt zur NLRP3-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen	149
4.2.2	Ap4 induziert die Freisetzung von IL-1 β in humanen Makrophagen	150
4.2.2.1	Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist NLRP3-unabhängig	152
4.2.3	Einfluss des K ⁺ -Efflux auf die IL-1 β -Freisetzung.....	152
4.2.4	Beteiligung verschiedener Rezeptoren an der Ap4-vermittelten Reaktion	153
4.2.4.2	P2X4 Rezeptoren sind nicht an der Ap4-induzierten IL-1 β -Freisetzung beteiligt.....	154
4.2.4.3	Der Ap4-induzierte Calciumeinstrom ist abhängig von P2Y-Rezeptoren und unabhängig von P2X7-Rezeptoren.....	154
4.2.4.4	Beteiligung von P2Y-Rezeptoren an der IL-1 β -Freisetzung	156
4.2.5	Die Verarbeitung von Pro-IL-1 β in aktives IL-1 β	157

4.2.5.1	Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung von Caspasen.....	157
4.2.5.2	Caspase-unabhängige Verarbeitung von Pro-IL-1 β in aktives IL-1 β : Einfluss anderer Proteasen	159
4.2.6	Einfluss des <i>Primings</i> auf die NLRP3-Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung.....	160
4.2.7	Einfluss von Metallothioneinen und Zink an der IL-1 β -Freisetzung	161
4.2.8	NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen: Fazit	162
4.3	Einfluss von HDAC6 auf NLRP3-vermittelte Entzündungsreaktionen.....	164
4.3.1	PROTAC LS-91 führt zum Abbau von HDAC6 in Makrophagen	164
4.3.2	Die PROTAC-vermittelte Reduzierung der IL-1 β -Ausschüttung ist unabhängig von den HDAC6-Proteingehalten.....	165
4.3.3	Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Freisetzung von IL-1 β	166
4.3.4	Einfluss von HDAC6 auf das <i>Priming</i>	167
4.3.5	Rolle von HDAC an NLRP3-bedingten Entzündungen: Fazit	169
5.	Zusammenfassung / Summary	171
5.1	Zusammenfassung	172
5.2	Summary	176
6.	Literaturverzeichnis	179
7.	Auflistung der Veröffentlichungen und Förderungen.....	211
7.1	Originalarbeiten	212
7.2	Manuskripte in Vorbereitung.....	212
7.3	Vorträge.....	212
7.4	Posterbeiträge	212
7.5	Stipendien und Förderungen.....	213

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AIM2	<i>absent in melanoma 2</i>
AP-1	<i>activator protein-1</i>
Ap4	Adenosintetraphosphat
Ap5A	Diadenosinpentaphosphat
Ap6A	Diadenosinhexaphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ASC	<i>apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BMDM	aus dem Knochenmark stammende Makrophagen (<i>bone marrow-derived macrophages</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
BzATP	2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP
bzw.	beziehungsweise
BV	Brilliant Violett
ca.	circa
CARD	<i>caspase activation and recruitment domain</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD1	katalytische Domäne 1
CD2	katalytische Domäne 2
CDL	CARD-Domänenlinker
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CTCL	kutanes T-Zell-Lymphom
DAMPs	gefährdungsassoziierte molekulares Muster (<i>danger-associated molecular pattern</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DTT	DL-Dithiothreitol
ECL	erhöhte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>

FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLICA	fluorochrom-markierten Caspase-1-Inhibitoren (<i>fluorochrome inhibitor of caspases</i>)
Fluo-4 AM	Fluo-4 Acetoxymethylester
FMO	<i>fluoreszenz-minus-one</i>
FOS	<i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSDMD	Gasdermin D
GSDMD-CT	C-terminale Domäne von GSDMD
GSDMD-NT	N-terminale Domäne von GSDMD
HAT	Histonacetyltransferase
HBSS	Hanks' Balanced Salt solution
HCl	Hydrochlorid
HDAC	Histondeacetylase
HDAC6	Histon-Deacetylase 6
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMGB1	<i>high mobility group box-1 protein</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSF1	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor-1
IDL	Interdomänenlinker
IL	Interleukin
IL-1RAcP	IL-1-Rezeptor-akzessorischem Protein
IL1R1	IL-1-Rezeptor Typ 1
IL1R2	IL-1-Rezeptor Typ 2
IMiD	<i>immunomodulatory imide drug</i>
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRF	Interferon-regulierender Faktor
ITC	isotherme Titrationskalorimetrie (<i>isothermal titration calorimetry</i>)
K ⁺	Kalium
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucinreichen Wiederholungsdomäne (<i>leucine-rich repeat</i>)

MDMs	von Monozyten abstammende Makrophagen (<i>monocyte derived macrophages</i>)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MT	Metallothioneine
MTOC	Zentrosom (<i>microtubule-organizing center</i>)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NAMPT	Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase
NAPT	Nicotinat-Phosphoribosyltransferase
NEK7	<i>NIMA-related Kinase 7</i>
NES	Kernexportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGS	<i>next generation sequencing</i>
NLR	<i>nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich repeats</i>
NLRC4	<i>NLR family CARD domain containing 4</i>
NLRP3	<i>nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing protein 3</i>
NLS	Kernlokalisierungssignale (<i>nuclear localization signal</i>)
ns	nicht signifikant
OD	optische Dichte
OMVs	äußere Membranvesikel (<i>outer membrane vesicles</i>)
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle (<i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEI	Polyethylenimin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POI	Zielprotein (<i>protein of interest</i>)
PROTAC	<i>proteolysis targeting chimeras</i>
PRR	Mustererkennungsrezeptor (<i>pathogen recognition receptor</i>)
PTM	posttranskriptionellen Modifikationen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PYD	Pyrin-Domäne
qPCR	quantitative PCR

RFU	<i>relative fluorescence unit</i>
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxidative species</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Insitut
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat - Polyacrylamidgelelektrophorese
SEAP	sekretierte embryonale alkalische Phosphatase
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>standard error of mean</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
UV	ultraviolett
z. B.	zum Beispiel
ZnF-UBP	Ubiquitin-bindenden Zinkfingerdomände

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Aufbau einer NLRP3-Inflammasom Untereinheit.	4
Abbildung 1.2: NLRP3-Inflammasom-Aktivierung.	6
Abbildung 1.3: Struktur der Pro-Caspase-1 und der aktiven Caspase-1.	8
Abbildung 1.4: Bildung von IL-1 β über nicht-kanonische Inflammasom-Aktivierung.	10
Abbildung 1.5: Struktur von Ap4 und ATP.	12
Abbildung 1.6: Aufbau von HDAC6.	15
Abbildung 1.7: Rolle von HDAC6 in Entzündungsprozessen.	17
Abbildung 1.8: PROTAC-Mechanismus.	19
Abbildung 1.9: Struktur und Wirkung des HDAC6-PROTACs LS-91 und der Kontrollsubstanz SLW118.	20
Abbildung 2.1: Isolierung von PBMCs aus Buffycoat.	56
Abbildung 2.2: SEAP-Reporter-Test mit HEK Blue IL-1 β Reporterzellen.	66
Abbildung 2.3: Prinzip der YO-PRO-1 Färbung zur Untersuchung der P2X7-Rezeptoraktivität.	70
Abbildung 3.1: Pam ₃ CSK ₄ <i>Priming</i> von PBMCs ist für die Freisetzung von IL-1 β unerlässlich.	90
Abbildung 3.2: Für die IL-1 β -Freisetzung der THP-1 Monozyten sind 6 Stunden Stimulationszeit erforderlich.	91
Abbildung 3.3: <i>Priming</i> von THP-1 Makrophagen ist für die Freisetzung von bioaktivem IL-1 β unerlässlich.	92
Abbildung 3.4: Die ATP- und BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist vom P2X7-Rezeptor abhängig.	94
Abbildung 3.5: Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration inhibiert die Nigericin- und senkt die P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Freisetzung.	95
Abbildung 3.6: Die P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist NLRP3-unabhängig.	97
Abbildung 3.7: Der Einfluss von Caspasen auf die IL-1 β -Freisetzung.	99
Abbildung 3.8: Der Einfluss verschiedener Proteasen auf die IL-1 β -Freisetzung.	101
Abbildung 3.9: Die gleichzeitige Hemmung sowohl des K ⁺ -Effluxes als auch der Serinproteasen zusammen mit Caspasen zeigen keine additiven Effekte auf die IL-1 β - Freisetzung.	102
Abbildung 3.10: ATP, BzATP und Nigericin haben keinen Einfluss auf die Genexpression verschiedener Serinproteasen.	103
Abbildung 3.11: Der Einfluss des <i>Primings</i> durch verschiedene TLR-Liganden auf die IL-1 β -Freisetzung.	105

Abbildung 3.12: Der Einfluss verschiedener TLR-Liganden auf die P2X7-Rezeptorexpression.	106
Abbildung 3.13: Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in <i>geprimten</i> PBMCs.	107
Abbildung 3.14: Beeinflussung der Zytokinfreisetzung durch Ap4-Stimulation von PBMCs.	109
Abbildung 3.15: Ap4 induziert die Freisetzung von IL-1 β in <i>geprimten</i> THP-1 Monozyten..	110
Abbildung 3.16: Ap4 induziert konzentrationsabhängig die Freisetzung von bioaktivem IL-1 β in <i>geprimten</i> THP-1 Makrophagen.	111
Abbildung 3.17: Einfluss der Stimulation von THP-1 Makrophagen mit Ap4 auf die IL-8- und TNF-Freisetzung.	112
Abbildung 3.18: Einfluss verschiedener P2X-Rezeptoren auf die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung.	113
Abbildung 3.19: Ap4 induziert einen Calciumeinstrom in THP-1 Makrophagen.	114
Abbildung 3.20: Ap4-induziert einen Calciumeinstrom in THP-1 Monozyten.	115
Abbildung 3.21: Der Ap4-induzierte Calciumeinstrom wird hauptsächlich durch G _q -gekoppelte Rezeptoren vermittelt.	116
Abbildung 3.22: YO-PRO-Färbung in THP-1 Makrophagen.	117
Abbildung 3.23: Die Transfektion der HEK293 Zellen mit dem P2X7-Rezeptor ist erfolgreich.	118
Abbildung 3.24: YO-PRO-Färbung in P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen.	119
Abbildung 3.25: In P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen vermittelt die Ap4-Stimulation keinen Calciumeinstrom.	121
Abbildung 3.26: Ap4 als P2X7-Rezeptor-Modulator.	121
Abbildung 3.27: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig vom K ⁺ -Efflux.	122
Abbildung 3.28: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist NLRP3-unabhängig.	123
Abbildung 3.29: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist Caspase-1 unabhängig.	124
Abbildung 3.30: In THP-1 Monozyten ist die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung Caspase-1-unabhängig.	125
Abbildung 3.31: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig von Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen.	126
Abbildung 3.32: Aus U937 Promonozyten generierte Makrophagen exprimieren typische Differenzierungsmarker und reagieren auf LPS.	129
Abbildung 3.33: Morphologische Unterschiede von U937 Promonozyten und Makrophagen.	129
Abbildung 3.34: In U937 Makrophagen induziert Ap4 die Freisetzung von IL-1 β	130

Abbildung 3.35: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in U937 Zellen ist NLRP3-unabhängig.....	131
Abbildung 3.36: RNA-Sequenzierung und Gene-Ontology Analyse von THP-1 Makrophagen, die mit ATP oder Ap4 behandelt wurden.	134
Abbildung 3.37: Zeitabhängiger HDAC6-Abbau durch LS-91.....	136
Abbildung 3.38: Konzentrationsabhängiger HDAC6-Abbau nach 24 h Inkubation mit LS-91.....	137
Abbildung 3.39: LS-91 und SLW118 zeigen keine Zytotoxizität.	139
Abbildung 3.40: 24 Stunden Inkubation mit LS-91 senkt die ATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Sekretion.....	141
Abbildung 3.41: Der Einfluss von LS-91 und SLW118 auf das Pam ₃ CSK ₄ -vermittelte <i>Priming</i>	142
Abbildung 3.42: Einfluss der Einzelkomponenten von PROTAC LS-91 und SLW118 auf die ATP-induzierte IL-1 β -Ausschüttung.	144
Abbildung 3.43: Eine Stunde Inkubation mit Tubastatin A senkt die ATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Ausschüttung nicht.....	145
Abbildung 4.1: Möglicher Mechanismus für die NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung durch humane Makrophagen nach P2X7-Rezeptor-Aktivierung.	163
Abbildung 4.2: HDAC6 beeinflusst das <i>Priming</i> in Makrophagen.	169

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte	24
Tabelle 2.2: verwendete Software.....	25
Tabelle 2.3: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien	26
Tabelle 2.4: verwendete Primersequenzen.....	27
Tabelle 2.5: Verwendete Zelllinien	28
Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Reagenzien.....	28
Tabelle 2.7: Polylysin-Lösung	33
Tabelle 2.8: Komplementiertes RPMI 1640 Medium.....	34
Tabelle 2.9: Einfriermedium für THP-1 Monozyten und U937 Monozyten	34
Tabelle 2.10: Differenzierungsmedium für THP-1 Makrophagen.....	34
Tabelle 2.11: Differenzierungsmedium für U937 Makrophagen.....	34
Tabelle 2.12: Wachstumsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten	35
Tabelle 2.13: Selektionsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten	35
Tabelle 2.14: Einfriermedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten	35
Tabelle 2.15: Stimulationsmedium für THP-1 KO NLRP3 Zellen	36
Tabelle 2.16: Differenzierungsmedium für THP-1 KO NLRP3 Makrophagen	36
Tabelle 2.17: PBS mit EDTA.....	36
Tabelle 2.18: Wachstums- und Stimulationsmedium für HEK293 Zellen.....	36
Tabelle 2.19: Einfriermedium für HEK293 Zellen	37
Tabelle 2.20: PEI-Lösung.....	37
Tabelle 2.21: Transfektionsmedium für HEK293 Zellen.....	37
Tabelle 2.22: Basalmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen.....	37
Tabelle 2.23: Selektionsmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen	38
Tabelle 2.24: Einfriermedium für HEK Blue IL-1 β Zellen	38
Tabelle 2.25: 0,5 M Natrium-EDTA-Lösung	38
Tabelle 2.26: TBE-Puffer (5x konzentriert).....	39
Tabelle 2.27: Master-Mix für Mykoplasmen-Test	39
Tabelle 2.28: Agarosegel für Mykoplasmentest	39
Tabelle 2.29: Stocklösungen von Stimulationsreagenzien und Inhibitoren.....	40
Tabelle 2.30: Tris-Base 1 M	41
Tabelle 2.31: QUANTI-blue Substratlösung.....	42
Tabelle 2.32: FACS-Puffer	42
Tabelle 2.33: YO-PRO-Puffer.....	42
Tabelle 2.34: Annexin V-Bindungspuffer.....	43

Tabelle 2.35: MTT-Lösung	43
Tabelle 2.36: LDH-Reaktionsmix.....	43
Tabelle 2.37: PBS für ELISA.....	44
Tabelle 2.38: ELISA-Waschpuffer	44
Tabelle 2.39: ELISA-Stopp-Lösung.....	44
Tabelle 2.40: TRIS-HCl Lösung (1M).....	45
Tabelle 2.41: Natriumdeoxycholat-Lösung (10 %)	45
Tabelle 2.42: Natriumchlorid-Lösung (10 %).....	45
Tabelle 2.43: EDTA-Lösung (50 mM).....	45
Tabelle 2.44: RIPA-Basalpuffer.....	45
Tabelle 2.45: RIPA-Puffer	46
Tabelle 2.46: DTT-Lösung (40x)	46
Tabelle 2.47: DTT/Lämmli-Mix	46
Tabelle 2.48: APS-Lösung 10 %	47
Tabelle 2.49: Laufgel (10 % Polyacrylamid Gel)	47
Tabelle 2.50: Sammelgel.....	47
Tabelle 2.51: Laufpuffer für die Elektrophorese (10x).....	48
Tabelle 2.52: Laufpuffer für die Elektrophorese (1x).....	48
Tabelle 2.53: Transfer-Puffer (10x)	48
Tabelle 2.54: Transfer-Puffer (1x)	48
Tabelle 2.55: TBS-Puffer (10x).....	48
Tabelle 2.56: TBS-Puffer (1x).....	49
Tabelle 2.57: TBS-T-Puffer	49
Tabelle 2.58: 5 % Milch in TBS-T.....	49
Tabelle 2.59: 5 % BSA in TBS-T	49
Tabelle 2.60: Puffer für Fluoreszenzantikörper	49
Tabelle 2.61: Auflistung der benutzten Antikörper für den Western Blot und die dazugehörige Verdünnung	50
Tabelle 2.62: DEPC-Wasser	50
Tabelle 2.63: 70%iger Ethanol in DEPC-Wasser	50
Tabelle 2.64: HBSS + HEPES Pufferlösung	51
Tabelle 2.65: Calcium-Waschpuffer	51
Tabelle 2.66: Farbstoffladepuffer	51
Tabelle 2.67: Volumina für die Beschichtung der Zellkulturplatten mit Polylysin-Lösung	52
Tabelle 2.68: Verwendete Zellsuspensionsvolumina zum Einsäen von THP-1 Zellen	54
Tabelle 2.69: Verwendete Mengen zur Herstellung des Plasmid-PEI-Komplexes	58

Tabelle 2.70: PCR Amplifikation für den Mykoplasmen-Test.....	62
Tabelle 2.71: Zellartspezifische Zellzahlen für Stimulationsversuche.....	63
Tabelle 2.72: Arbeitskonzentration der eingesetzten Stimulanzen	63
Tabelle 2.73: Cytoflex Durchflusszytometer.....	67
Tabelle 2.74: Verwendete fluoreszenzmarkierte Antikörper und Lebend-/Tot-Marker für die Bestimmung der Oberflächenmarker-Expression mittels Durchflusszytometrie.....	69
Tabelle 2.75: Pipettierschema für Annexin/Zombie Aqua-Test.....	74
Tabelle 2.76: Temperaturprotokoll für die cDNA-Synthese.....	83
Tabelle 2.77: Temperaturprotokoll für die qPCR.....	84

1. Einleitung

Interleukin (IL)-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, das maßgeblich an der Regulation von Entzündungsreaktionen sowie der Modulation der Immunantwort beteiligt ist und einen wesentlichen Anteil am angeborenen Immunsystems einnimmt (1). Obwohl es antibakterielle und antivirale Wirkungen fördert, wird es auch mit Schmerzen und autoinflammatorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht, die durch wiederkehrende Fieberschübe mit lokalen und systemischen Entzündungen gekennzeichnet sind (2–6). Eine fehlerhafte Regulation der Synthese- und Freisetzungprozesse von IL-1 β kann zur Entstehung von IL-1-vermittelten Krankheiten führen, zu denen unter anderem rheumatoide Arthritis, neuropathische Schmerzen, entzündliche Darmerkrankungen, Typ-2 Diabetes, Gefäßerkrankungen, multiple Sklerose und die Alzheimer-Krankheit gehören (5,7). Deshalb ist es wichtig, den Generierungsprozess von IL-1 β genauer zu erforschen, um neue Ansätze für die Therapie zu erhalten.

1.1 Interleukin-1 β

IL-1 β gehört zur Familie der IL-1 Zytokine, die insgesamt 11 verschiedene Zytokine umfasst (5). Es wird von Immunzellen wie Makrophagen, Monozyten und Dendritischen Zellen, aber auch von Phagozyten, Fibroblasten und Endothelzellen ausgeschüttet (7). Dabei wird es zunächst als Interleukin-1 β -Vorläuferprotein (Pro-IL-1 β) produziert, das dann inaktiv im Zytosol vorliegt (6,8). Durch proteolytische Spaltung an der Asparaginsäure-Stelle (zwischen D116 und D117) wird die 31 kDa-Form (Pro-IL-1 β) in eine reife biologisch aktive 17 kDa-Form (IL-1 β) umgewandelt, und kann dann aus der Zelle freigesetzt werden (Kapitel 1.1.1) (9,10). IL-1 β wirkt als endogenes Pyrogen und ist um ein Vielfaches potenter als andere Pyrogene wie Tumornekrosefaktor (TNF) (11).

Nach seiner Freisetzung bindet aktives IL-1 β an den IL-1-Rezeptor Typ 1 (IL1R1), der daraufhin mit dem IL-1-Rezeptor-akzessorischen Protein (IL-1RAcP) dimerisiert. Dadurch wird die MyD88-vermittelte intrazelluläre Signalübertragung induziert, was zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) oder AP-1 (*activator protein-1*) führt und damit die Produktion anderer proinflammatorischer Mediatoren wie TNF, IL-6 und IL-8 veranlasst (12). Durch IL-1 β kommt es zur Aktivierung von Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killerzellen, Dendritischen Zellen und Makrophagen, zur Induktion von Fieber und der Senkung der Schmerzschwelle (1,2,7,13). Darüber hinaus kann IL-1 β die Gefäßpermeabilität erhöhen und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen induzieren, die das Eindringen von Immunzellen in infiziertes oder beschädigtes Gewebe erleichtern (2).

Neben dem IL-1RI, kann IL-1 β auch am IL-1-Rezeptor Typ 2 (IL1R2) binden. Allerdings führt eine Bindung am IL1R2 nicht zur Signaltransduktion, wodurch der IL-1RII die Wirkung von IL-1 β begrenzt und auch als sogenannter „Lockvogel-Rezeptor“ bezeichnet wird (12).

1.1.1 Generierung von Interleukin-1 β über das NLRP3-Inflammasom

Die Generierung von IL-1 β erfolgt durch Spaltung von Pro-IL-1 β in seine aktive Form IL-1 β durch die Protease Caspase-1 (14). Die Caspase-1 liegt in der Zelle als inaktive Vorstufe vor, die als Pro-Caspase-1 bezeichnet wird. Die Aktivierung der Caspase-1 erfolgt über die Rekrutierung zu Multiproteinkomplexen, sogenannte kanonische Inflammasome. Sie bestehen aus der inaktiven Pro-Caspase-1, die gegebenenfalls über ein Adapterprotein mit einem zytosolischen Mustererkennungsrezeptor (*pathogen recognition receptor*, PRR) verbunden sind. Es gibt verschiedene Inflammasome, die sich in der PRR-Domäne unterscheiden und dadurch unterschiedliche gefährdungsassoziierte molekulare Muster (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) und pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) erkennen. Kanonische Inflammasome können aus PRRs, aus der Nukleotid-bindenden Leucin-reichen Wiederholungsdomäne (*nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich repeats*, NLR)-Familie wie NLRP (*nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing protein*)1, NLRP3 und NLRC4 (*NLR family CARD domain containing 4*), AIM2 (*absent in melanoma 2*) und Pyrin bestehen (15–17). Eine Aktivierung der Inflammasome über ihre PRRs führt zu deren Zusammenbau und Oligomerisierung, was die autoproteolytische Spaltung der Caspase-1 induziert und so die Spaltung von Pro-IL-1 β möglich macht.

Das am besten charakterisierte Inflammasom ist das NLRP3-Inflammasom. Es kommt vor allem in Zellen des angeborenen Immunsystems wie Makrophagen, Monozyten und Dendritische Zellen vor (18) und besteht aus NLRP3, dem Adapterprotein ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) und der Pro-Caspase-1 (19). Das NLRP3-Protein dient als Sensor, um PAMPs zu erkennen und besteht aus drei Regionen: der Pyrin-Domäne (PYD), der NACHT-Domäne und der leucinreichen Wiederholungsdomäne (*leucine-rich repeat*, LRR) (Abbildung 1.1). Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms erfolgt in Makrophagen in einem zweistufigen Prozess (18). Der erste Schritt erfolgt durch ein Initialisierungssignal, das sogenannte *Priming*, auf das ein Aktivierungssignal folgt, welches zur Bildung von NLRP3-Inflammasom-Bestandteilen führt (Abbildung 1.2).

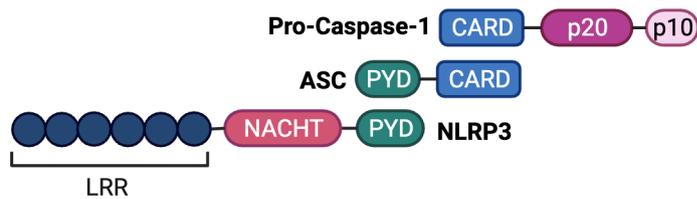


Abbildung 1.1: Aufbau einer NLRP3-Inflammasom Untereinheit. Das NLRP3-Inflammasom ist ein Komplex, der aus NLRP3, ASC und Pro-Caspase-1 besteht. NLRP3 besteht aus drei Regionen: der Pyrin-Domäne (PYD), der NACHT-Domäne und der leucinreichen Wiederholungsdomäne (LRR). NLRP3 rekrutiert ASCs durch PYD-PYD-Wechselwirkungen. Pro-caspase-1 wiederum wird von ASC über CARD-CARD-Wechselwirkungen rekrutiert, um das NLRP3-ASC-Procaspase-1-Inflammasom zu bilden. Abbildung modifiziert nach (10).

1.1.1.1 Priming

In humanen Makrophagen kann das *Priming* durch mehrere Stimuli ausgelöst werden. Dazu zählen PAMPs wie Lipopolysaccharide (LPS), synthetische Toll-like-Rezeptor (TLR)-Agonisten Pam₂CSK₄ und Pam₃CSK₄ oder proinflammatorische Zytokine wie TNF aber auch IL-1 β selbst, die jeweils an ihre korrespondierenden Rezeptoren binden (14,20,21). Die Aktivierung der Rezeptoren initiiert intrazelluläre Signalkaskaden, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führen. NF- κ B steigert in einem weiteren Schritt die Expression von Pro-IL-1 β , das in ruhenden Makrophagen nicht konstitutiv exprimiert wird, und NLRP3, das unter Ruhebedingungen nur in geringen Konzentrationen vorhanden ist (21). Die Expression von ASC, Pro-Caspase-1 und anderen Substraten, einschließlich Pro-IL-18, ist konstitutiv und wird durch das *Priming* in kultivierten Makrophagen nicht beeinflusst (15,21). Außerdem führt das *Priming* über TLRs zu posttranslatonalen Modifikationen (PTM) wie Phosphorylierung und Deubiquitinierung am NLRP3, die dessen Aktivierung und den Zusammenbau des Inflammasoms ermöglichen (22–24). Kürzere TLR-Stimulation (< 1 Stunde) löst die PTM des NLRP3-Proteins aus, eine längere TLR-Stimulation (> 3 Stunden) führt zur NF- κ B-vermittelten Transkription von neuen NLRP3-Molekülen (15). Während in humanen Makrophagen das *Priming* für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms erforderlich ist, ist es in humanen Monozyten entbehrlich (25–27).

1.1.1.2 NLRP3-Inflammasom-Aktivierung

Der zweite Schritt der Inflammasom-Aktivierung ist die Oligomerisierung von NLRP3 und der anschließende Zusammenschluss von NLRP3, ASC und Pro-Caspase-1 zu einem Komplex (18). Der PRR NLRP3 kann durch ein breites Spektrum an Stimuli aktiviert werden, die sich strukturell und chemisch unterscheiden (28). Die genauen Mechanismen, mit denen NLRP3 auf diese Vielzahl von Stimuli antwortet sind jedoch nur unzureichend bekannt. Es wird angenommen, dass NLRP3 nicht direkt

an die Moleküle bindet, sondern nachgeschaltete zelluläre Signale erkennt. Einerseits wurde nachgewiesen, dass zu diesen Signalen mitochondriale Dysfunktion und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxidative species*, ROS) (29), lysosomale Schäden und Ionenfluss (14) zählen (Abbildung 1.4). Andererseits zeigt eine andere Studie, dass der K^+ -Efflux das alleinige Signalereignis ist, welches verschiedene Stimuli verbindet und zur NLRP3-Inflammasom-Aktivierung führt (30). Der K^+ -Efflux kann beispielsweise durch Partikel wie Harnsäurekristalle erreicht werden. Harnsäurekristalle werden über Phago- oder Endozytose intrazellulär aufgenommen und lysosomal prozessiert. Dadurch können sie zu lysosomalen Schäden führen, sodass Cathepsine freigesetzt werden, die direkt oder indirekt über die Induktion eines K^+ -Efflux zur NLRP3-Inflammasom-Aktivierung führen (14,31). Außerdem führen porenbildende Toxine wie Nigericin und DAMPs wie Adenosintriphosphat (ATP), das an den purinergen P2X7-Rezeptor bindet, zu einem NLRP3-Inflammasom-aktivierenden K^+ -Efflux (30,32). NLRP3 liegt aufgrund einer internen Interaktion zwischen der NOD- und der LRR-Domänen in einer geschlossenen Konformation vor (33). Die NLRP3-Aktivierung leitet den Aufbau des Inflammasoms ein, indem es zu einer Konformationsänderung des NLRP3-Proteins kommt (33). Durch die Konformationsänderung von NLRP3 wird die LRR-Domäne freigelegt, sodass NEK7 (*NIMA-related Kinase 7*), eine Serin-Threonin-Kinase, bindet, die die Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms ermöglicht (34,35). Außerdem rekrutiert NLRP3 über PYD-PYD Wechselwirkungen das Adapterprotein ASC, welches dann über CARD-CARD (*caspase activation and recruitment domain*) Wechselwirkungen die Pro-Caspase-1 rekrutiert (Abbildung 1.1) (36). Die genaue Lokalisation, an der der Aufbau des NLRP3-Inflammasoms erfolgt, ist umstritten. Obwohl das endoplasmatische Retikulum, die Mitochondrien (37,38) und der Golgi-Apparat in Verbindung mit dem Inflammasom-Aufbau gebracht wurden (15,39,40), deuten aktuelle Forschungsergebnisse darauf hin, dass das NLRP3-Inflammasom am Zentrosom (*microtubule-organizing center*, MTOC), dem Hauptorganisationszentrum für Mikrotubuli in Säugetierzellen, zusammengebaut wird (41,42). Die Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms ist ein entscheidender Schritt für die autoproteolytische Aktivierung der Caspase-1, die dann Pro-IL-1 β , Pro-IL-18 und Gasdermin D (GSDMD) spaltet. Hierdurch entstehen GSDMD-Poren an der Zelloberfläche, durch die die Freisetzung von IL-1 β und IL-18 ermöglicht und schließlich die Pyroptose, ein entzündungsbedingter programmierter Zelltod, induziert wird (Kapitel 1.1.1.3) (19,36).

v

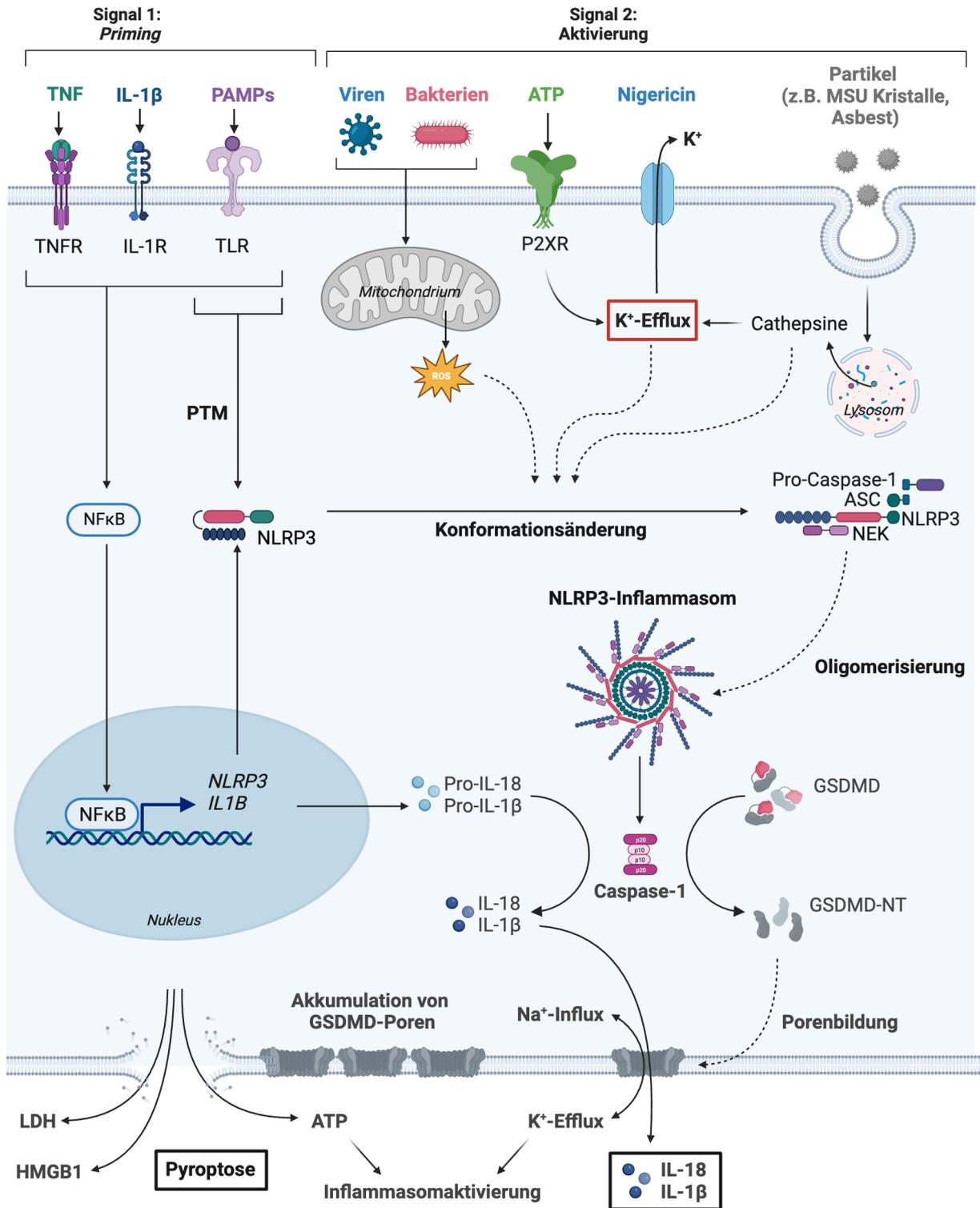


Abbildung 1.2: NLRP3-Inflammasom-Aktivierung. Eine Aktivierung von TNF-Rezeptoren, IL-1-Rezeptoren oder TLRs führt zur NF- κ B-abhängigen Transkription von NLRP3 und Pro-IL-1 β . NLRP3 erfährt außerdem posttranslationale Modifikation (PTM), die seine anschließende Aktivierung ermöglichen.

Dieser Schritt wird als *Priming* bezeichnet. Das 2. Signal, die eigentliche Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, kann durch verschiedene Stimuli erreicht werden. Der Sensor NLRP3 erfährt durch die Aktivierung eine Konformationsänderung und es kommt zur Zusammenlagerung und Oligomerisierung mit NEK7, dem Adapterprotein ASC und der Pro-Caspase-1, die sich zum NLRP3-Inflammasom zusammenlagern. Die Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms führt zur autoproteolytischen Aktivierung der Caspase-1, die IL-1 β und IL-18 aus seiner Vorläuferform generiert und zur Spaltung von GSDMD führt. Die freigesetzte aktive N-terminale Domäne GSDMD-NT bildet GSDMD-Poren in der Plasmamembran, durch die sowohl IL-1 β und IL-18 sezerniert werden als auch ein unspezifischer Ionenfluss stattfinden kann. Die Poren werden entweder repariert oder es erfolgt eine Akkumulation der GSDMD-Poren, die schließlich den inflammatorischen Zelltod induzieren, der auch als Pyroptose bezeichnet wird. Dadurch kommt es zur Plasmarruptur, wodurch intrazelluläre Alarmine wie LDH, HMGB1 und ATP freigesetzt werden. Abbildung modifiziert nach (14).

1.1.1.3 Aktivierung und Funktion der Caspase-1

Die Caspase-1 ist eine Cystein-Protease und gehört zur Klasse der selbstaktivierenden Entzündungs-Caspasen, die den Aufbau von Multiproteinkomplexen erfordern (10,43). Die Caspase-1 ist ein Zymogen, das aus drei Hauptdomänen besteht: die CARD-Domäne und zwei katalytischen Domänen, der p20 und der p10 Untereinheit. Die CARD-Domäne wird von einem CARD-Domänenlinker (CDL) von der p20 Untereinheit getrennt, die über einen Interdomänenlinker (IDL) von der p10 Untereinheit getrennt wird (Abbildung 1.3 A) (44). Die Prodomäne CARD ermöglicht die Rekrutierung der Pro-Caspase-1 zum NLRP3-Inflammasom über CARD-CARD Wechselwirkungen mit dem Adapterprotein ASC. Diese Wechselwirkungen sind von entscheidender Bedeutung, da sie die Dimerisierung der Pro-Caspase-1 induzieren, die zur Aktivierung der Caspase-1 durch Autoproteolyse führen (10,45). Während auf der großen p20 Untereinheit die katalytisch aktive Stelle (Cysteinrest285, C285) lokalisiert ist, bildet die p10 Untereinheit die Dimerschnittstelle (10). Da sich die Caspase-1 an mehreren Stellen innerhalb der beiden Linker-Domänen selbst prozessieren kann (Abbildung 1.3 A) (46), entstehen eine Vielzahl von dimeren Caspase-1-Spezies (10,44). Bislang konnten mehrere strukturelle Zusammensetzungen für die aktive Caspase-1 nachgewiesen werden (Abbildung 1.3 B). So wird angenommen, dass die aktive Form der Caspase-1 ein Heterotetramer (p20₂p10₂) aus zwei symmetrischen p20p10-Heterodimeren ist, die durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen verbunden sind (47–49). Andere Studien haben p33p10-Dimere als aktive Formen des Enzyms identifiziert (44). Eine Spaltung der IDL ist für alle angenommenen aktiven Formen erforderlich.

Da bei Inflammasom-Aktivierung die aktive Caspase-1 zusammen mit reifem IL-1 β sezerniert wird, werden in Zellstimulationsstudien Zellkulturüberstände auf die Spaltfragmente p10 und/oder p20 untersucht, die *in vitro* als Marker für die Aktivierung des Inflammasoms dienen (10,45).

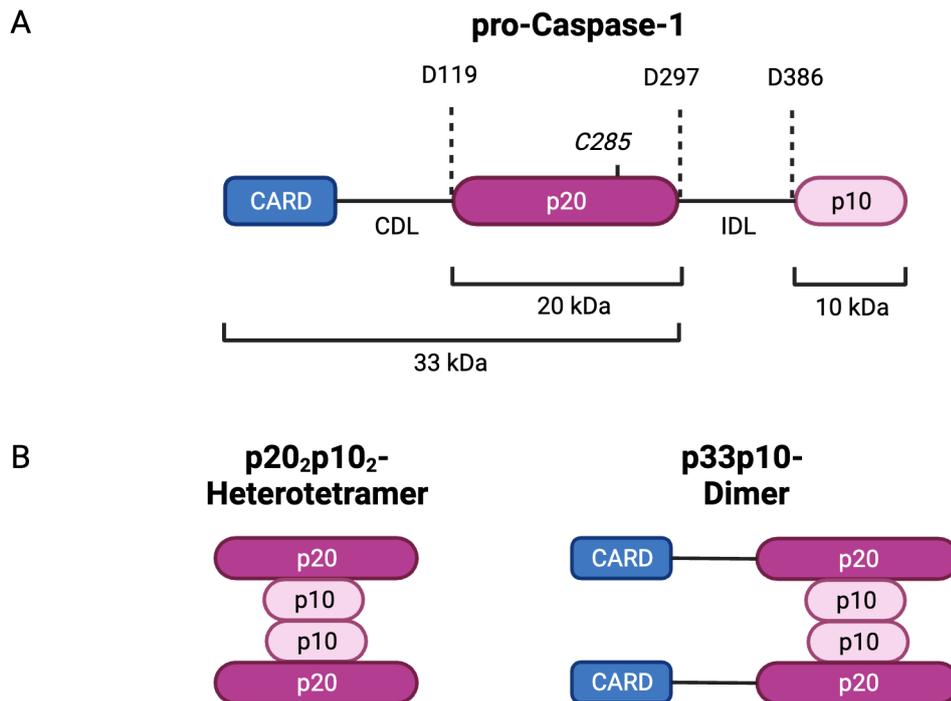


Abbildung 1.3: Struktur der Pro-Caspase-1 und der aktiven Caspase-1. (A) Struktur der humanen Pro-Caspase-1, die aus einer CARD-Domäne, einer p20 Untereinheit mit der katalytisch aktiven Domäne Cystein285 und der p10 Untereinheit besteht. Die autoproteolytische Spaltung kann an drei Asparaginsäureresten (D119, D297, D316) erfolgen. (CDL = CARD-Domänenlinker, IDL = Interdomänenlinker). (B) Mögliche Konformitäten der aktiven Caspase-1: p20₂p10₂-Heterotetramer aus zwei symmetrischen Heterodimeren oder p33p10-Dimer. Abbildung modifiziert nach (10).

1.1.1.4 Caspase-1-abhängige Gasdermin D Porenbildung führt zur Freisetzung von reifem IL-1 β und Pyroptose

Neben der Spaltung von Pro-IL-1 β in IL-1 β , wird über die aktive Caspase-1 auch die GSDMD Porenbildung ausgelöst, die zur Freisetzung von weiteren DAMPs und zu Pyroptose führen kann (9,50). GSDMD ist ein zytosolisches Protein, das aus zwei unterschiedlichen Domänen besteht. Die C-terminale Domäne (GSDMD-CT) wird durch einen Linker von der aktiven N-terminalen Domäne (GSDMD-NT) getrennt und übt eine autoinhibierende Funktion auf GSDMD-NT aus. Im Ruhezustand ist die Expression von GSDMD gering. Während des *Primings* wird die GSDMD-Expression über den Transkriptionsfaktor Interferon-regulierender Faktor (IRF) reguliert (51). Die Freisetzung des aktiven GSDMD-NT-Fragments erfordert eine proteolytische Spaltung innerhalb des Linkers. Die Spaltung kann entweder durch die aktive Caspase-1 erfolgen oder durch Caspasen-11/4/5, welche infolge der nicht-kanonischen Inflammasomenaktivierung aktiv werden (Kapitel 1.1.2) (50,52,53). Freigesetztes GSDMD-NT bindet an Phospholipide in der Plasmamembran, was zu seiner Oligomerisierung und zur Ausbildung von

Membranporen führt (54). Die GSDMD-Poren ermöglichen die Sekretion von reifem IL-1 β und IL-18, sowie den Durchtritt von Ionen (z. B. Na⁺-Influx, K⁺-Efflux) (55–57). Eine Anhäufung von GSDMD-Poren an der Plasmamembran führt schließlich zur Pyroptose (56). Pyroptotische Zellen weisen charakteristische morphologische Veränderungen auf, wie beispielsweise eine Zellschwellung, die schließlich zur Plasmamembranruptur mit anschließendem Zelltod führt. Durch die Plasmamembranruptur werden große zytosolische Moleküle wie Laktatdehydrogenase (LDH) und DAMPs wie HMGB1 (*high mobility group box-1 protein*) oder ATP in den extrazellulären Raum freigesetzt (56). Die Freisetzung von ATP kann ebenfalls wie der K⁺-Efflux aus der GSDMD-Pore die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung ermöglichen oder verstärken. Hierdurch wird die Immunreaktion weiter verstärkt.

Obwohl die Bildung von GSDMD-Poren im Allgemeinen zur Pyroptose führen, sind manche Zelltypen wie Makrophagen in der Lage, bioaktives IL-1 β freizusetzen und dabei gleichzeitig lebensfähig zu bleiben (58,59). Durch Membran-Reparaturmechanismen können diese Zellen die Anhäufung von GSDMD-Poren verhindern, wodurch die Pyroptose verhindert oder verzögert wird (58).

1.1.2 Generierung von IL-1 β durch nicht-kanonische-Inflammasome

Die Generierung von IL-1 β kann auch über die Aktivierung von nicht-kanonischen-Inflammasomen erfolgen. Nicht-kanonische Inflammasome sind solche, die zur Aktivierung der Caspase-11 bei Mäusen oder Caspase-4/5 beim Menschen führen (52,60). Beim Aufbau von nicht-kanonischen-Inflammasomen fungiert die Caspase-11/4/5 dabei selbst als Sensor und Effektor. Extrazelluläres LPS kann wie bereits erwähnt über den TLR das kanonische Inflammasom aktivieren. Intrazelluläres LPS hingegen kann über die Lyse gramnegativer Bakterien oder die zelluläre Aufnahme von bakteriellen äußeren Membranvesikeln (*outer membrane vesicles*, OMVs) Zugang zum Zytosol erhalten (16,61–63). Es interagiert so mit der CARD-Domäne der Caspase-11/4/5, die dann eine Oligomerisierung durchläuft, was zur autokatalytischen Aktivierung der jeweiligen Caspase-Untereinheit führt (50,64). Im Gegensatz zur Caspase-1, spaltet die aktivierte Caspase-11/4/5 die proinflammatorischen Zytokine Pro-IL-1 β und Pro-IL-18 nicht direkt in ihre reifen Formen (65). Sie spaltet GSDMD (Kapitel 1.1.1.4), was letztlich einen K⁺-Efflux und Pyroptose mit der Freisetzung von ATP auslöst. Extrazelluläres ATP aktiviert den P2X7-Rezeptor (Kapitel 1.2.1), was ebenfalls einen K⁺-Efflux auslöst. Der K⁺-Efflux initiiert die Aktivierung des kanonischen NLRP3-Inflammasoms, wodurch es schließlich zur Caspase-1-abhängigen Bildung von IL-1 β und IL-18 kommt (Abbildung 1.4).

Die basale Expression der Caspase-4/5 beim Menschen und Caspase-11 bei der Maus unterscheiden sich je nach Zelltyp und kann durch ein *Pre-priming* mit verschiedenen TLR-Agonisten und Interferonen (IFN- α und IFN- γ) hochreguliert werden (14,52,66,67).

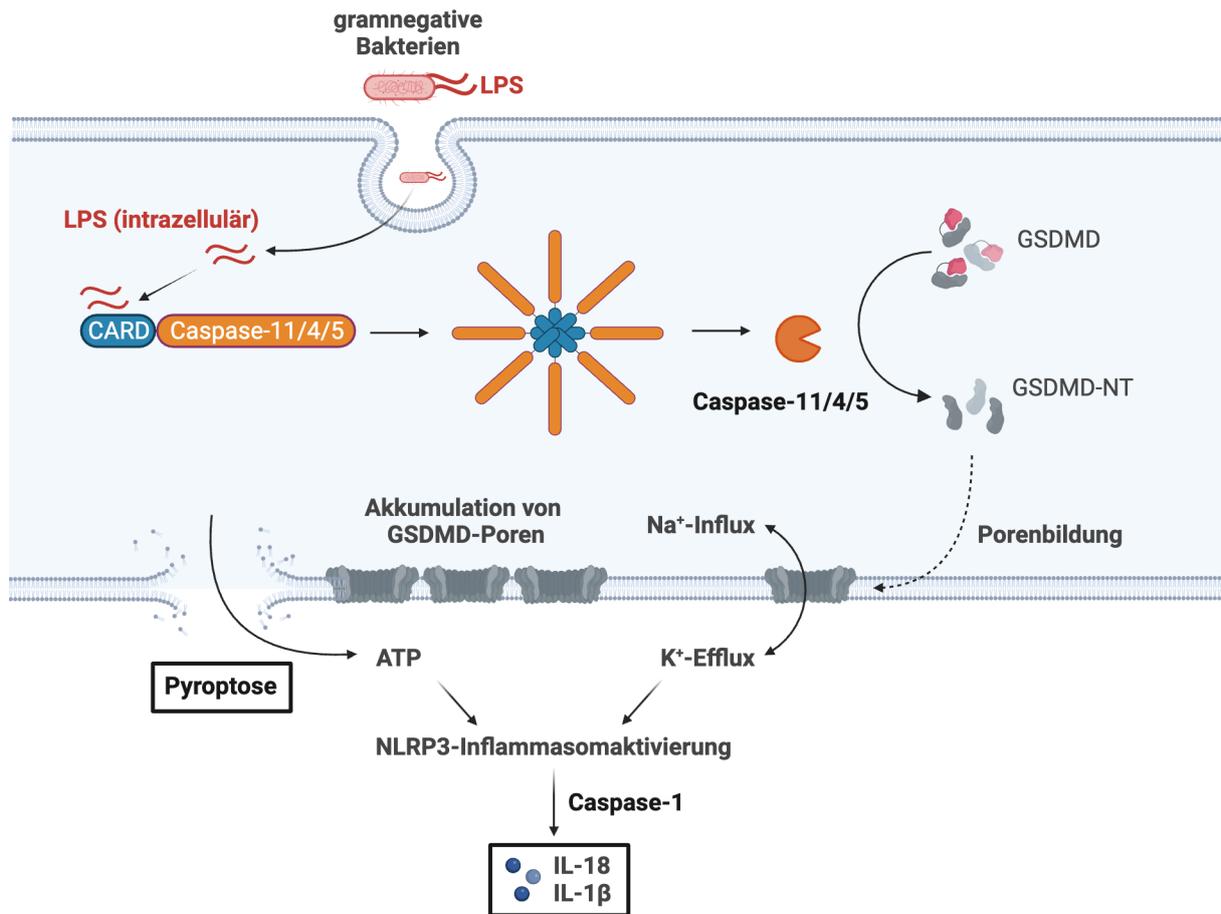


Abbildung 1.4: Bildung von IL-1 β über nicht-kanonische Inflammasom-Aktivierung. Die Erkennung von intrazellulärem LPS durch Caspase-11/4/5 führt zur Oligomerisierung der jeweiligen Caspase, die zur autoproteolytischen Aktivierung ihrer Untereinheit führt. Die aktive Caspase spaltet GSDMD. Die Bildung von GSDMD-Poren an der Plasmamembran löst Pyroptose und die Freisetzung von ATP und K⁺ aus, die die Bildung des NLRP3-Inflammasoms induzieren und zur Caspase-1-vermittelten IL-1 β -Freisetzung führen. Abbildung modifiziert nach (14).

1.2 Purinerge P2X- und P2Y-Rezeptoren

ATP ist einer der am besten untersuchten DAMPs (66,68). Extrazelluläres ATP aktiviert die purinergen P2X- und P2Y-Rezeptoren an der Zelloberfläche (69). P2X-Rezeptoren sind membrangebundene, ligandengesteuerte Ionenkanäle, die in Wirbeltieren ubiquitär exprimiert werden und neben Entzündungsprozessen auch an der Herzkreislaufregulation, Alzheimer und der Schmerzentscheidung beteiligt sind (69). Es sind sieben Gene für verschiedene Isoformen bekannt (P2X1-P2X7), die jeweils aus zwei Transmembrandomänen, sowie einer großen extrazellulären Schleife zusammengesetzt sind. Diese Isoformen sind in der Lage, in der Zellmembran sowohl homomere als auch heteromere Kanäle zu bilden (70,71). Nach Bindung eines Liganden wie beispielsweise ATP an der extrazellulären Schleife

(72), kommt es zu einer Konformationsänderung und damit zur Öffnung der inneren Pore, die permeabel für Kationen wird. Kalium kann gemäß des Konzentrationsgradienten aus der Zelle ausströmen, während es zu einem Natrium- und Calciueinstrom in die Zelle kommt (73–75).

ATP aktiviert auch P2Y-Rezeptoren. P2Y-Rezeptoren sind metabotrope Rezeptoren, die zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) gehören und je nach Subtyp durch Adenin- oder Uridin-Nukleotide aktiviert werden (73). Bislang wurden acht Subtypen der P2Y-Subfamilie identifiziert (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 und P2Y14), die in zwei Untergruppen unterteilt werden. P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-Rezeptoren sind G_q gekoppelt, während P2Y12, P2Y13 und P2Y14-Rezeptoren G_i gekoppelt sind (76). Eine Aktivierung der G_q -gekoppelten Rezeptoren erhöht die intrazelluläre Calciumkonzentration. Dies geschieht über die Aktivierung der Phospholipase C, die zu einer Erhöhung der Inositol-1,4,5-trisphosphat-(IP₃)-Konzentration führt, was die Mobilisierung von Calcium aus den intrazellulären Speichern bedingt (76,77). Generell spielen purinerge P2-Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Behandlung von entzündlichen Erkrankungen (78).

1.2.1 P2X7-Rezeptor

Der am meisten an Entzündungen beteiligte purinerge P2-Rezeptor ist der P2X7-Rezeptor, der vermehrt auf Immunzellen wie Makrophagen exprimiert wird (70,71). Durch seine niedrige Affinität zu ATP ist er in gesundem Gewebe inaktiv. Hohe ATP-Konzentrationen an Entzündungsherden oder Tumoren können jedoch zu einer Aktivierung des Rezeptors führen (70,79,80). Die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP oder den stärkeren Agonisten 2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) (80,81) führt über den nachgeschalteten K^+ -Efflux zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, welches die Freisetzung von IL-1 β vermittelt (70).

Neben dem Kationentransport führt die Aktivierung des P2X7-Rezeptors außerdem zur Membranpermeabilität für große kationische Moleküle mit einer Masse bis 900 kDa (82). Es wird vermutet, dass eine anhaltende P2X7-Rezeptorstimulation zur Ausbildung von unselektiven Membranporen führt, welche für die Durchlässigkeit der Plasmamembran gegenüber kationische synthetische Moleküle wie dem Farbstoff YO-PRO-1 verantwortlich sind (82–86). Allerdings ist es umstritten, ob der P2X7-Rezeptor möglicherweise auch selbst eine farbstoffdurchlässige Pore bildet (87).

1.3 Adenosintetraphosphat

Adenosintetraphosphat (Ap₄) ist ein endogenes Nukleotid. Es besteht aus einem Adenosin, welches über sein 5'-Ende der Ribose mit einer linearen Kette von vier Phosphatgruppen verbunden ist (Abbildung 1.5). Dies verleiht Ap₄ eine strukturelle Ähnlichkeit zu ATP. Der Unterschied liegt in der Anwesenheit einer zusätzlichen Phosphatgruppe.

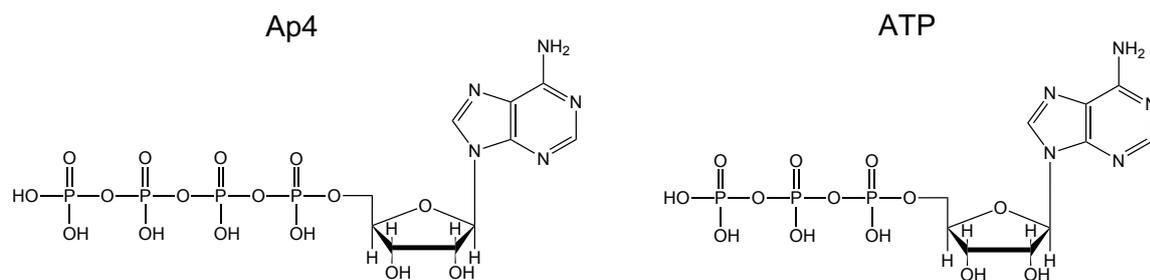


Abbildung 1.5: Struktur von Ap4 und ATP.

Ap4 wurde erstmals in der quergestreiften Muskulatur von Säugetieren identifiziert (88–90) und wurde seitdem auch in der Leber (91), in chromaffinen Zellen der Nebenniere (92–94), im Kammerwasser des Auges (95), in Thrombozyten (93), im Myokard (96) und in humanem Plasma nachgewiesen (97). Dabei waren die Konzentrationen im Plasma doppelt so hoch wie die von ATP.

Die endogene Biosynthese von Ap4 ist noch nicht vollständig geklärt. *In vitro* Studien deuten darauf hin, dass die Akkumulation von Ap4 hauptsächlich enzymatisch erfolgt. Es werden Mechanismen beschrieben, die den Transfer von Phosphatresten von einem Phosphatdonor auf ATP katalysieren. So kann die Phosphatübertragung von Adenosindiphosphat (ADP) auf ATP über die Adenylatkinase des Skelettmuskels (98), von 1,3-Bis-Phosphoglycerat über die Phosphoglyceratkinase von Hefen (90) oder von einem Enzym-Phosphat-Zwischenprodukt über die mutierte Succinyl-Coenzym-A-Synthetase von *Escherichia coli* (99) erfolgen. Auch in der Chromaffingranula findet die Ap4-Synthese über einen Transphosphorylierungsprozess auf ATP statt (94). Die Enzyme Nicotinamid-Phosphoribosyltransferase (NAMPT) und Nicotinat-Phosphoribosyltransferase (NAPT), die normalerweise an der NAD-Biosynthese beteiligt sind, katalysieren über ihre fakultative ATPase-Aktivität die reversible Synthese von Ap4 aus ATP ebenfalls über einen Phosphattransfer (100). Da eine Korrelation zwischen den intrazellulären und extrazellulären Expressionsspiegeln von NAMPT und Ap4 in murinen Zellen und Plasma festgestellt wurde, deutet dies darauf hin, dass NAMPT die Ap4-Homöostase in verschiedenen Säugetiergeweben regulieren kann. Die zweite Gruppe von Enzymen katalysiert die Ap4-Synthese über die Übertragung eines Adenylatrests oder Nukleotidrests auf Triphosphate, wie beispielsweise die Acyl-CoA-Synthetase von *Pseudomonas fragi* (101), die Acetyl-CoA-Synthetase von Hefen (102), die Aminoacyl-tRNA-Synthetase (103), Glühwürmchenluciferase (104) und die T4 DNA-Ligase (105). Im extrazellulären Raum kann die Ap4-Konzentration durch den Abbau der Dinukleotide Diadenosinpentaphosphat (Ap5A) und Diadenosinhexaphosphat (Ap6A) erhöht werden (106). Phosphodiesterasen und Diadenosinpolyphosphatthydrolasen wurden als solche Ekto-Nukleotidasen im extrazellulären Raum von Nerven-, Endothel- und chromaffinen Zellen nachgewiesen (94,106–108). Als nicht enzymatischer Prozess wird außerdem Dismutation beschrieben (109).

Der Abbau von Ap₄ zu ATP erfolgt spezifisch durch eine Nukleosid-5'-Tetraphosphat-Hydrolase (110), durch Exophosphatasen mit geringer Substratspezifität (110), sowie durch NAMPT oder NAPT (100). Apyrasen entfernen die Phosphate nacheinander, wobei AMP als finales Produkt entsteht (106). Dennoch ist Ap₄ wesentlich stabiler gegenüber ektoenzymatischer Hydrolyse als ATP (93,107). Die Hydrolyse von Ap₄ beträgt nach einer zweiminütigen Inkubation nur 2 %, während die von ATP in derselben Zeit 75 % beträgt (93).

Die vollen physiologischen Funktionen von Ap₄ sind noch nicht bekannt. Jedoch wird vermutet, dass Ap₄ bei entsprechendem Stimulus aus den Thrombozyten oder der Chromaffingranula in den Blutkreislauf freigesetzt wird und die Thrombin-vermittelte Thrombozytenaggregation hemmt (93) bzw. den Blutdruck reguliert, indem es sowohl metabotrope (P₂Y) als auch ionotrope (P₂X) Purin-Rezeptoren aktiviert (93). So kann Ap₄ die Koronardurchblutung steuern, indem es über Bindung an endotheliale P₂Y₁-Rezeptoren der Koronararterien zur Vasodilatation und über P₂X-Rezeptoren auf den glatten Gefäßmuskelzellen des Herzens zur Vasokonstriktion führt (96). Durch Aktivierung von P₂X-Rezeptoren bewirkt Ap₄ verschiedene Effekte. Im Vas deferens (111), der glatten Gefäßmuskulatur (95,96) und der Mesenterialarterie (112) führt Ap₄ zur Vasokonstriktion. Gleichzeitig senkt es den Augeninnendruck (95). Im synaptischen Spalt des zentralen Nervensystem führt Ap₄ zu Signalübertragung, indem es P₂X₁ oder P₂X₃ Rezeptoren stimuliert (93). Darüber hinaus wurde Ap₄ als Agonist des P₂X₄ Rezeptors identifiziert (113).

Es ist bereits bekannt, dass Ap₄ in der Niere als potenter, vom Endothel-stammender Vasokonstriktor wirkt, indem es P₂X₁-Rezeptoren stimuliert (97). Da Ap₄ langsam abgebaut wird, begünstigt dies neben der hohen Affinität von Ap₄ zu P₂X-Rezeptoren eine starke und langanhaltende vasokonstriktive Wirkung, die stärker ist als die ATP-vermittelte Vasokonstriktion.

Wie bereits erwähnt, aktiviert Ap₄ verschiedene P₂-Rezeptoren, wie P₂Y₁, P₂X₁ und P₂X₄ (97,113,114). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten von Ap₄ mit ATP ist es möglich, dass Ap₄ auch an andere Purinrezeptoren wie P₂X₇-Rezeptoren binden könnte. Über dessen Aktivierung könnte es zur Freisetzung von NLRP3-abhängigem IL-1 β führen (115). Das NLRP3-Inflammasom wird mit persistierenden, niedriggradigen, sterilen Entzündungen in Verbindung gebracht (116,117), die im Laufe des natürlichen Alterns auftreten und als „Inflamming“ bezeichnet werden (118,119). Diese Entzündungsreaktionen tragen zur Entwicklung und zum Fortschreiten von Niereninsuffizienz bei (120). Außerdem können IL-1 β -bedingte Entzündungsreaktionen Arteriosklerose fördern, die eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie von Herz-Kreislaufkrankungen spielen (118,121–123). Arteriosklerose und chronische Entzündung der Gefäßwände sind bei chronischen Nierenerkrankungen häufig und gehen mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einher (124–130). Da P₂X₇-Rezeptoren unter physiologischen Bedingungen in der Niere exprimiert werden und unter pathophysiologischen Bedingungen, etwa bei chronischer Niereninsuffizienz oder entzündlichen Nierenerkrankungen, hochreguliert werden (131–135), könnte eine P₂X₇-Rezeptoraktivierung durch Ap₄ eine Rolle bei der

Pathophysiologie von Gefäßerkrankungen spielen und zur Förderung von chronischen Nierenerkrankungen beitragen.

1.4 Histondeacetylasen

Histondeacetylasen (HDACs) und Histonacetyltransferasen (HATs) halten das Gleichgewicht zwischen den Acetylierungsniveaus von zytoplasmatischen und kernständigen Proteinen aufrecht, was für die Homöostase der Zelle unerlässlich ist (136). Indem es Acetylgruppen von Histonen und Nicht-Histonproteinen entfernt, regulieren HDACs die Transkription zahlreicher Proteine und Prozesse (137). Bislang wurden 18 humane HDAC-Isoformen identifiziert, die aufgrund ihrer Sequenzidentität und katalytischen Aktivität in vier Klassen unterteilt werden. Bei den Klassen I (HDAC1, 2, 3 und 8), II (Klasse IIa: HDAC4, 5, 7, 9, Klasse IIb: HDAC6, 10) und IV (HDAC11) handelt es sich um Zn^{2+} -abhängige Histonacetylasen. Die Aktivität der Enzyme der Klasse III (Sirtuine 1-7) dagegen sind vom Cofaktor Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD^+) abhängig. HDACs der Klasse I werden ubiquitär exprimiert und sind aufgrund des Vorhandenseins eines Kernlokalisierungssignals (*nuclear localization signal*, NLS) hauptsächlich im Zellkern lokalisiert. Die Isoenzyme der Klasse II werden eher gewebsspezifisch exprimiert und besitzen sowohl ein Kernlokalisierungssignal (NLS) als auch ein Kernexportsignal (*nuclear export signal*, NES) – außer HDAC9 (nur NLS) und HDAC10 (nur NES) – die ein Pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma ermöglichen (138–141).

1.4.1 HDAC6

Histon-Deacetylase 6 (HDAC6) ist ein Isoenzym, das zur HDAC-Klasse IIb gehört und sich von den anderen HDAC-Isoformen unterscheidet. Es ist das einzige Isoenzym der HDAC-Familie, das zwei katalytische Domänen (CD1 und CD2) besitzt (138). Neben den beiden katalytischen Domänen für die zinkabhängige Deacetylierung, enthält HDAC6 eine carboxyterminale Ubiquitin-bindende Zinkfingerdomäne (ZnF-UBP) (142–144) und eine zytoplasmatische Verankerungsdomäne (SE14), die HDAC6 neben des Kernexportsignals eine Lokalisation außerhalb des Zellkerns ermöglicht (143,145) und ausschlaggebend für die Interaktion mit zytosolischen Substraten ist. Der Aufbau von HDAC6 ist in Abbildung 1.6 dargestellt.



Abbildung 1.6: Aufbau von HDAC6. HDAC6 besitzt zwei zinkabhängige katalytische Domänen (CD1, CD2), eine zytoplasmatische Verankerungsdomäne (SE14) und eine Ubiquitin-bindende Zinkfingerdomäne (ZnF-UB). HDAC6 enthält außerdem ein Kernlokalisierungssignal (NLS) und ein Kernexportsignal (NES). Die Abbildung ist modifiziert nach (138).

HDAC6 trägt zur mikrotubuli- und aktinabhängigen Zellmotilität bei, indem es α -Tubulin (145,146) bzw. Cortacin (147,148) deacetyliert. Außerdem entfernt HDAC6 Acylgruppen von anderen zytosolischen Proteinen, darunter Hitzeschockprotein Hsp90 (149,150), Peroxiredoxin (151), Hitzeschock-Transkriptionsfaktor-1 (HSF1) (152) und Ku70 (153).

Neben seiner entscheidenden katalytischen Funktionen, die über die katalytische Domäne (CD2) von HDAC6 vermittelt werden (154), spielt HDAC6 aufgrund seiner ZnF-UBP eine zentrale Rolle bei der Beseitigung fehlgefalteter Proteine (155,156). Ubiquitinierte Protein-Aggregate, die zu groß für einen Abbau durch das Proteasom sind, binden an die ZnF-UBP von HDAC6 und werden mittels Dynein retrograd zum MTOC transportiert. Dort bilden sie Aggresome, die durch Autophagie degradiert werden können (144,155,157–159). Außerdem steht HDAC6 im Zusammenhang mit mehreren Krankheiten wie Krebs (160–162), Autoimmunerkrankungen (163), Depression (164) und Entzündung (165), deshalb ist die Entwicklung von selektiven HDAC6-Inhibitoren von besonderem Interesse (138,166,167).

Die Wirksamkeit von nicht-selektiven HDAC-Inhibitoren in der Krebstherapie wurde vielfach nachgewiesen (166,168–170). SAHA (auch bekannt unter Vorinostat, Zolinza[®]) war der erste klinisch erfolgreiche pan-HDAC-Inhibitor, der 2006 von der *Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen wurde (171). SAHA hemmt neben HDAC6 unter anderem auch HDAC1, 2 und 3 (172,173).

In der wissenschaftlichen Forschung kommt häufig Tubastatin A als experimenteller, selektiver HDAC6-Inhibitor zum Einsatz (174–176). Allerdings befinden sich derzeit auch mehrere HDAC6-Inhibitoren (darunter KA2507, ACY-241 und ACY-1215) zur Behandlung menschlicher Erkrankungen wie Krebs, diabetischer Neuropathie und rheumatoider Arthritis in klinischen Testungen (138–142).

1.4.2 Die Rolle von HDAC6 bei Entzündungsprozessen

Die Beteiligung von HDAC6 an entzündlichen Reaktionen ist noch nicht im Detail erforscht. Man geht davon aus, dass HDAC6 die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms reguliert (177), daher ist HDAC6 ein

potenzielles therapeutisches Ziel für NLRP3-bedingte Krankheiten. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig geklärt.

In Mauszellen und THP-1 Zellen ist HDAC6 für den Aufbau und die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms entscheidend (42,178). Da die NLRP3-Inflammasom-Komponenten für eine NLRP3-Aktivierung ubiquitiniert vorliegen müssen (179–182), kann HDAC6 – mithilfe seiner ZnF-UBP-Domäne und Dynein – den Transport von ubiquitiniertem NLRP3 vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) entlang des Mikrotubuli-Apparats zum MTOC steuern. Dort erfolgt die Zusammenlagerung mit der im Zentrosom lokalisierten Kinase NEK7, dem Adapter ASC und der Caspase-1, die für die anschließende Prozessierung von Pro-IL-1 β in IL-1 β erforderlich ist (42) (Abbildung 1.7).

Die Bedeutung der katalytischen Domäne von HDAC6 bei der Regulation der NLRP3-Aktivität ist umstritten (42,175,183). Zur vollständigen Untersuchung der Rolle von HDAC6 in NLRP3-vermittelten Entzündungsprozessen ist die Verwendung traditioneller HDAC6-Inhibitoren möglicherweise nicht geeignet, da aktuelle selektive HDAC6-Inhibitoren nur auf die katalytische Domäne (CD2) des Enzyms abzielen (154,184). Um auch die ZnF-UBP-Domäne zu hemmen, ist ein gezielter Abbau von HDAC6 von Vorteil (184). Der Einsatz der PROTAC-Technologie könnte mithilfe des Ubiquitin-Proteasom-Systems den gezielten Abbau von HDAC6 erreichen, wodurch es zur Hemmung des NLRP3-Inflammasoms kommt.

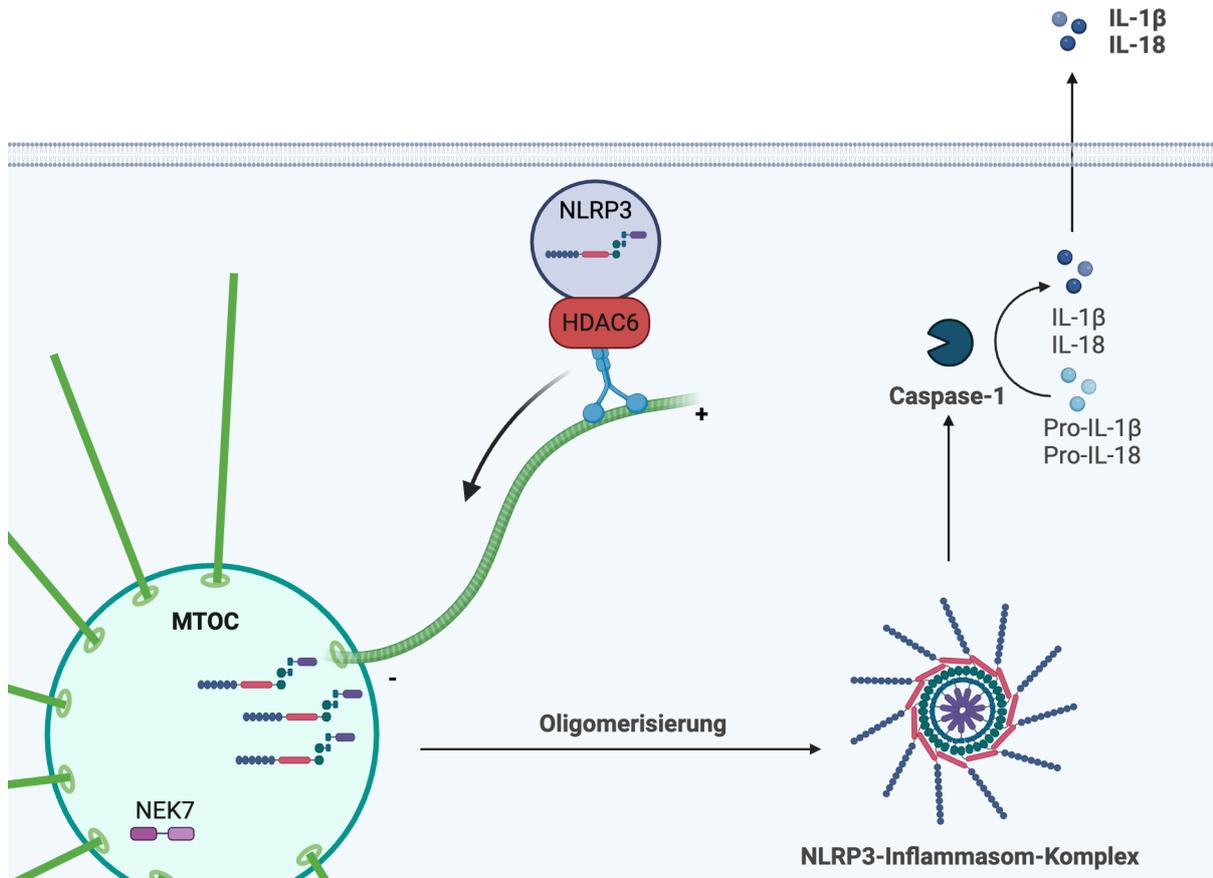


Abbildung 1.7: Rolle von HDAC6 in Entzündungsprozessen. HDAC6 fungiert als Dynein-Adapter und ermöglicht den retrograden Transport von NLRP3 zum MTOC, wo die Zusammenlagerung mit NEK7 erfolgt. Es kommt zur Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasom-Komplexes. Das aktivierte NLRP3-Inflammasom setzt aktive Caspase-1 frei, die die Prozessierung von Pro-IL-1 β /IL-18 einleitet.

1.5 PROTACs

Proteolysis targeting chimeras (PROTACs) sind bifunktionelle Moleküle, die sich als vielversprechender Ansatz für den gezielten Proteinabbau erwiesen haben (185,186). Im Gegensatz zu herkömmlichen Inhibitoren, die an ein Protein binden und dessen Funktion hemmen, wirken PROTACs, indem sie sich das zelleigene Ubiquitin-Proteasom-System für den Proteinabbau zu Nutze machen und damit ein Zielprotein selektiv aus der Zelle entfernen. Die PROTAC-Strategie kann daher besonders bei Targets nützlich sein, die sich mit herkömmlichen niedermolekularen Arzneimitteln nur schwer modulieren lassen und eröffnet somit neue Wege zur Regulation krankheitsverursachender Proteine und damit neue therapeutische Ansätze.

Ein PROTAC besteht aus zwei aktiven Protein-bindenden Domänen, die durch einen Linker miteinander verknüpft sind (185,187–189). Ein Ligand ermöglicht die Bindung an eine E3-Ligase wie beispielsweise an die E3-Ligase Cereblon. Der andere Ligand bindet an das Zielprotein (*protein of interest*, POI), das

abgebaut werden soll. Sobald das PROTAC an das Zielprotein bindet, bringt es die E3-Ligase in unmittelbare Nähe. Es kommt zur Bildung eines ternären Komplexes, aus E3-Ligase, PROTAC und POI, der die Polyubiquitinierung des Zielproteins einleitet und damit ein entscheidender Schritt beim proteasomalen Abbau des Zielproteins durch PROTACs ist. E3-Ligasen sind Enzyme, die die Übertragung von Ubiquitinmolekülen von einem E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzym auf das Zielprotein erleichtern. Das E2-Enzym bindet zunächst gleichzeitig an die E3-Ligase und das Zielprotein. Dadurch kann die E3-Ligase Ubiquitin vom E2-Enzym auf einen Lysinrest des Zielproteins übertragen. Nachfolgende Ubiquitin-Moleküle werden dann an das erste Ubiquitin-Molekül angehängt, um eine Polyubiquitin-Kette zu bilden. Durch Polyubiquitinierung wird das Zielprotein für den Abbau durch die Proteasom-Maschinerie der Zelle markiert und es kommt zur zielgerichteten Degradierung des Zielproteins durch das Proteasom (185,188). Der Mechanismus ist in Abbildung 1.8 dargestellt.

Nach Markierung des Zielproteins löst sich das chimäre PROTAC mit einem Arm wieder ab und führt die E3 Ubiquitin Ligase zum nächsten baugleichen Protein, um dieses für den Abbau zu markieren (185). Durch die Wiederverwertung des PROTACs ist eine geringere Dosis nötig (190), weshalb die Zytotoxizität gering bleibt. Der Einsatz der PROTAC-Strategie in der Therapie gegen Krankheiten bietet weitere Vorteile. Da PROTACs selektiv auf bestimmte krankheitsverursachende Proteine abzielen und nicht auf genetischer oder transkriptioneller Ebene wirken, vermitteln sie potenziell eine Wirkung mit weniger Off-Target-Effekten und Nebenwirkungen gegenüber herkömmlichen niedermolekularen Arzneistoffen.

Der Abbau des Zielproteins erfolgt unabhängig von dessen enzymatischer Aktivität oder Expressionsniveaus, weshalb PROTACs möglicherweise die Entwicklung von Arzneimittelresistenzen verhindern können (190,191). Außerdem handelt es sich bei PROTACs in der Regel um kleine Moleküle, die im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern oder Gentherapien oral verabreicht werden können, so dass eine seltenere und erleichterte Applikation ermöglicht wird (188). Die Wirkdauer ist abhängig davon, wie schnell die Zelle das degradierte Protein wieder neu herstellen kann.

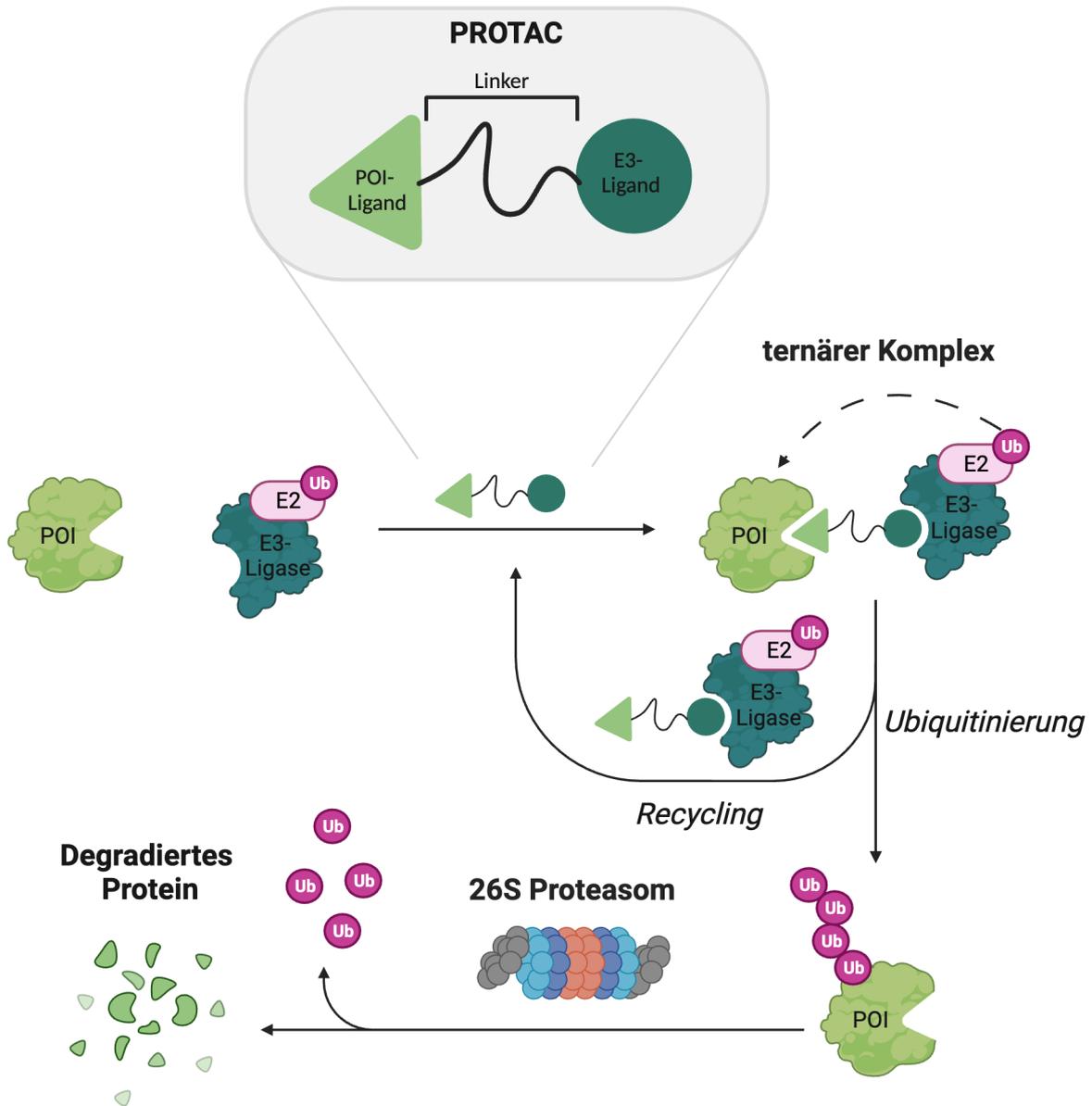


Abbildung 1.8: PROTAC-Mechanismus. Nach Bildung des ternären Komplexes – bestehend aus dem Zielprotein (POI), PROTAC und E3-Ligase – katalysiert die E3-Ligase die Polyubiquitinierung des POI, welches schließlich proteasomal abgebaut wird. Abbildung modifiziert nach (190).

In den letzten Jahren wurden viele PROTACs entwickelt, die auf verschiedene Proteine abzielen und sich bereits in der klinischen Prüfung zur Behandlung von Krebs und Autoimmunerkrankungen befinden (191–195). Das PROTAC ARV-110 (ein Androgenrezeptor-Degradierer) hat bereits Phase II und ARV-471 (ein Östrogenrezeptor-Degradierer) sogar Phase III Studien erreicht. Beide zeigen vielversprechende Daten in Bezug auf Verträglichkeit, Sicherheit und Wirksamkeit (196–198).

1.5.1 PROTAC-vermittelter HDAC6-Abbau

Da die ZnF-UBP-Domäne von HDAC6 maßgeblich an der Regulation des NLRP3-Inflammasoms beteiligt ist, niedermolekulare HDAC6-Inhibitoren allerdings nur auf die katalytische Domäne (CD2) des Enzyms abzielen (154,184), werden HDAC6-PROTACs eingesetzt, um HDAC6 gezielt zu eliminieren. Nachdem 2018 der erste HDAC6-Degradierer entwickelt wurde (199), gibt es mittlerweile verschiedene HDAC6-PROTACs, die sich in den Liganden für die Bindung von HDAC6 und der E3-Ligase unterscheiden (178,200–203).

Das HDAC6-PROTAC LS-91 besteht aus SAHA und Thalidomid, die durch einen Linker miteinander verknüpft sind. SAHA bindet an HDAC6, während Thalidomid an die E3-Ligase Cereblon bindet, was zur Ubiquitinierung und zum anschließenden Abbau von HDAC6 über das Proteasom führt.

SLW118 wird als Negativkontrolle eingesetzt. Es bindet über SAHA an HDAC6 und besitzt ein methyliertes Thalidomid. Da der Glutarimidring von Thalidomid für die Bindung an die E3-Ligase entscheidend ist (204), verhindert die Methylierung am Glutarimidring die Bindung von SLW118 an die E3-Ligase (205,206) und damit die Ubiquitinierung und den Abbau von HDAC6. Sowohl LS-91 als auch SLW118 wurden von Silas Wurnig aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Finn Hansen synthetisiert. Die Struktur von LS-91 und SLW118 ist in Abbildung 1.9 dargestellt.

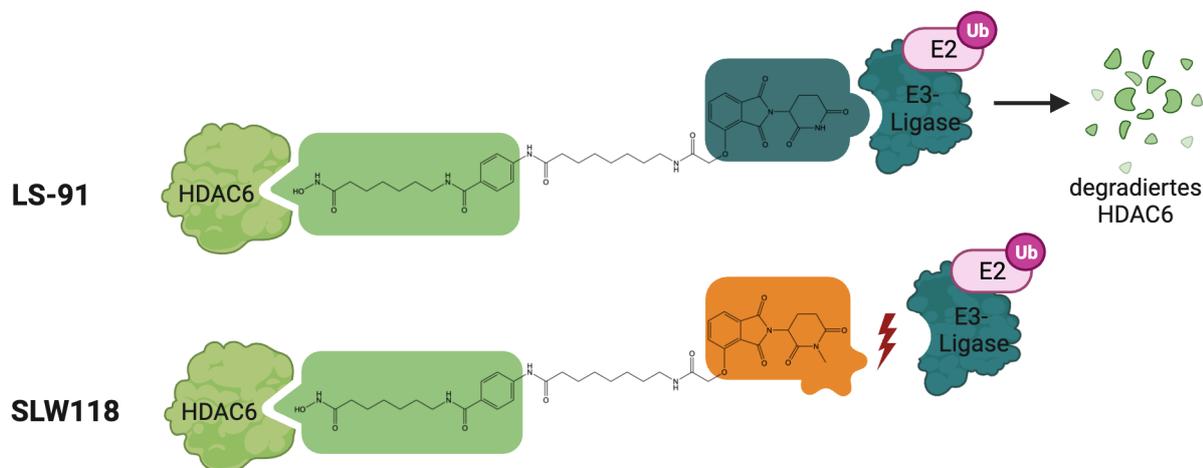


Abbildung 1.9: Struktur und Wirkung des HDAC6-PROTACs LS-91 und der Kontrollsubstanz SLW118.

LS-91 und SLW118 sind bifunktionelle Moleküle, die mit einem Linker verknüpft sind. LS-91 und SLW118 enthalten beide den HDAC-Liganden SAHA (hellgrün). LS-91 besteht außerdem aus Thalidomid (dunkelgrün), das an die E3-Ligase bindet und dadurch die Degradierung von HDAC6 vermittelt. SLW118 enthält stattdessen methyliertes Thalidomid (SLW120, orange), das unfähig ist an die E3-Ligase zu binden, weshalb der proteasomale Abbau verhindert wird. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

1.6 Zielsetzung

Entzündungsreaktionen dienen als essenzielle Abwehrmechanismen des Immunsystems gegen schädliche Reize oder Infektionen. Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β ist maßgeblich an der Initiierung von Entzündungsreaktionen beteiligt. Die Freisetzung von IL-1 β kann durch verschiedene Signalwege gesteuert werden. Eine dysregulierte Entzündungsreaktion kann allerdings auch zu chronischen Krankheiten führen. So wird IL-1 β in Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis, entzündlichen Darmerkrankungen, Typ-2-Diabetes, Gefäßerkrankungen und Multiple Sklerose gebracht. Dies macht deutlich, dass es von großer Bedeutung ist, die zugrundeliegenden Mechanismen der IL-1 β -Freisetzung besser zu erforschen.

In dieser Arbeit sollen die Signalwege charakterisiert werden, die zur Freisetzung von NLRP3-abhängiger und NLRP3-unabhängiger IL-1 β in Makrophagen führen. Dazu wird die IL-1 β -Freisetzung am Beispiel von (i) P2X7 (Rezeptor), (ii) Ap4 (Ligand) und (iii) HDAC6 (regulierendes Protein) untersucht.

- (i) Es wird angenommen, dass die Stimulation des P2X7-Rezeptors die IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen durch Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auslöst. Bis heute werden Entzündungssignale häufig an Makrophagen aus dem Knochenmark von Mäusen untersucht (30); humane Makrophagen werden jedoch selten betrachtet. Deswegen ist ein Ziel dieser Arbeit, den zugrunde liegenden Mechanismus der P2X7-Rezeptor-vermittelten IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen zu untersuchen. Für die Untersuchungen sollen aus der humanen THP-1 Zelllinie generierte THP-1 Makrophagen verwendet werden. Unter Verwendung immunologischer und molekularbiologischer Verfahren soll dabei vor allem die Beteiligung des NLRP3-Inflammasom-Signalwegs an der P2X7-vermittelten IL-1 β -Freisetzung genauer analysiert werden.
- (ii) Außerdem soll die immunmodulatorische Wirkung von Ap4 untersucht werden. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zwischen Ap4 und ATP ist es denkbar, dass der aus dem Endothel stammende Vasokonstriktor Ap4 neben der Bindung an P2X1-Rezeptoren (97) ebenfalls über den P2X7-Rezeptor wirken kann und so die IL-1 β -Freisetzung induziert wird. Dies könnte zu schädlichen Entzündungsreaktionen führen, die Gefäßerkrankungen und chronische Niereninsuffizienz begünstigen. Daher soll herausgefunden werden, ob die Wirkung von Ap4 mit der Wirkung von ATP vergleichbar ist. Insbesondere soll die Beteiligung von P2X-Rezeptoren und des NLRP3-Inflammasoms an der immunmodulierenden Wirkung von Ap4 überprüft werden. Um gezielt den Einfluss von Ap4 auf den P2X7-Rezeptor zu untersuchen, sollen transfizierte HEK293 Zellen für die Untersuchungen herangezogen werden. Außerdem soll getestet werden, ob die zuvor identifizierten Vorgänge und Mechanismen sich allein auf THP-1 Makrophagen beziehen oder auch auf andere Zelllinien wie U937 Makrophagen übertragbar sind. Dieses Erkenntnis ist ein wichtiger Schritt für mögliche spätere Anwendungen im humanen Organismus.

Dafür soll im Zuge dieser Arbeit die optimalen Differenzierungsmethoden für die U937 Zelllinie etabliert werden. Diese Arbeit soll ein besseres Verständnis der Auswirkungen von Ap4 auf Monozyten und Makrophagen schaffen und damit einen Beitrag zur Entwicklung neuer therapeutische Ansätze bei Entzündungen leisten.

- (iii) Es wird davon ausgegangen, dass HDAC6 die Aktivität des NLRP3-Inflammasoms reguliert (177). Daher ist HDAC6 ein potenzielles therapeutisches Ziel für NLRP3-bedingte Krankheiten. Da der zugrunde liegende molekulare Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, soll im letzten Teil dieser Arbeit die Rolle von HDAC6 bei der Freisetzung von IL-1 β über das NLRP3-Inflammasom in humanen Makrophagen untersucht werden. Um zu analysieren, ob die ZnF-UBP-Domäne oder die katalytische Domäne von HDAC6 bei der NLRP3-Inflammasom-vermittelten IL-1 β -Freisetzung entscheidend ist, sollen PROTACs zum gezielten Abbau von HDAC6, geeignete Kontroll-PROTACs, sowie HDAC6-Inhibitoren zum Einsatz kommen. Bisher befinden sich bereits PROTACs zur Behandlung von Krebs oder Autoimmunerkrankungen in der klinischen Prüfung (191–195). Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich die PROTAC Strategie auch für den Einsatz von NLRP3-Inflammasom-assoziierten Krankheiten eignen könnte, oder ob eine pharmakologische Hemmung der katalytischen Domäne durch HDAC6-Inhibitoren maßgeblich die IL-1 β Freisetzung hemmt.

Insgesamt sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, das Verständnis der intrazellulären Mechanismen der IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen grundlegend zu erweitern. Diese Erkenntnisse könnten die Grundlage für neue therapeutische Ansätze bei autoinflammatorischen Erkrankungen bilden, die mit IL-1 β in Verbindung stehen. Dies trägt zum besseren Verständnis und potenziell zur Verbesserung der Behandlung dieser Erkrankungen bei.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

Gerät	Modellbezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe	Vaccubrand	BRAND GmbH + CO KG
Absaugvorrichtungen		BRAND GmbH + CO KG VWR International GmbH
Analysenwaage	AG204	Mettler-Toldeo GmbH
	AG285	Mettler-Toldeo GmbH
	XS205 DualRange	Mettler-Toldeo GmbH
Autoklav	Laboklav 135	SHP Steriltechnik AG
Brutschrank	Binder C150	Binder GmbH
	HeraCell 240i	Thermo Fisher Scientific
Durchflusszytometer	CytoFLEX	Beckman Coulter
Elektrophoresenetztteil	Power Pac HC	BioRad Laboratories GmbH,
Gefrierkombination (4 °C/ -35 °C)	ML300c	Electrolux Hausgeräte GmbH
Gefrierschrank (-20 °C)		Liebherr-International Deutschland GmbH
		Eppendorf AG
Gefrierschrank (-80 °C)	Eppendorf	Eppendorf AG
Geldokumentationssystem	ChemiDoc MP Imager	BioRad Laboratories GmbH
Gelelektrophoresesystem	Mini-PROTEAN Tetra Cell	BioRad Laboratories GmbH
	Mini-Sub Cell GT Horizontal	BioRad Laboratories GmbH
UV-Gerät	Nano-Drop One	Thermo Fisher Scientific
UV-Vis Spektralphotometer	GENESYS 50 UV-Vis	Thermo Fisher Scientific
Lichtmikroskop	Primo Vert	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Magnetrührer	Variomag	VWR International GmbH
Mikroplattenleser	Mitras ² LB 943	Berthold Technologies GmbH & Co.
		Molecular Devices
Mikroplattenleser mit Pipettierroboter	Flex Station 3	Phoenix Instrument GmbH
pH Meter	EL-30	Carl Roth GmbH + Co. KG
Pinzetten		Eppendorf AG
Pipetten	Eppendorf Research/ Research Plus	BRAND GmbH + CO KG
Pipettierhilfe	accu-jet pro	Thermo Fisher Scientific
Plattenwaschgerät	Wellwash	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Plattformschüttler	Titramax 1000 mit Hei-MIX	
	Inkubator 1000	

Präzisionswaagen	AK160	Mettler-Toldeo GmbH
	PB1502-S	Mettler-Toldeo GmbH
qPCR-System	qTOWER ³ G touch	Analytik Jena AG, Jena
Reinstwasseranlage	LaboStar 2-DI/-UV	SG-Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
	Milli-Q, Milipore Biocel A10	Merck
Sterilwerkbank	Hera Safe HS12/ HSP15	Heraeus Holding GmbH
Stickstofftank	Arpege 70	Air Liquid Medical GmbH
	XL-100	Taylor-Wharton
	LS4800	Labrepcó
Tischzentrifuge		Starlab
Trockenschrank	Memmert UM500	Memmert GmbH + Co KG
Vortexer	Genie 2	Bender & Hobein AG
	MS1 Minishaker	IKA Werke GmbH & Co. KG
Western Blot Transfersystem	Trans-Blot Turbo Transfersystem	BioRad Laboratories GmbH
Wasserbäder	Thermolab	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
	TW12	Julabo GmbH
Wippschüttler	WT16	Biometra GmbH
Zellzählgerät	Luna fl	Logos biosystems
Zellzählkammer	LUNA reusable slides	Logos biosystems
	Neubauer	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Zentrifugen	5415C	Eppendorf AG,
	5417C	Eppendorf AG
	Allegra 25 R	Beckmann Coulter
	Avanti J-20 XP	Beckman Coulter
	Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH

2.1.2 Software

Tabelle 2.2: verwendete Software

Software	Anbieter	Anwendung
BioRender	BioRender	Visualisierung, Erstellung von Abbildungen
CytExpert Software	Beckmann Coulter	Durchflusszytometrische Datenauswertung
Flow Jo 10.8.1	BD Bioscience	Durchflusszytometrische Datenauswertung

GraphPad Prism 9	GraphPad Software	Visualisierung, Erstellen von Diagrammen, Statistik, Auswertung von Daten
Image Lab 6.1	BioRad Laboratories	Western Blot Analyse
Microsoft Excel	Microsoft Corporation	Allgemeine Auswertung
MikroWin Lite 2010	Labsis Laborsysteme GmbH	Datenauswertung von Messungen des Mitras ² LB 943
qPCRsoft 4.1	Analytik Jena AG	qPCR Datenauswertung von Messungen mit dem qTOWER3G touch

2.1.3 Plastik- und Glaswaren und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.3: Auflistung aller verwendeten Verbrauchsmaterialien

Reagenz/ Verbrauchsmaterial	Hersteller	Artikelnummer
Abdeckfolie für die qPCR	BioRad Laboratories GmbH	MSB1001
Corning 96-Well Platte, schwarz	VWR	7341609
Falthandtücher (Zellstoff)	Hildebrandt & Bartsch GmbH & Co. KG	2054126
Flex Station Pipettenspitzen	VWR	MLDV9000-0911
Kosmetiktücher	Hildebrandt & Bartsch GmbH & Co. KG	2054692
Kryoröhrchen	SARSTEDT AG & Co. KG	72.379
Microcon 10kDa Centrifugal Filter	Merck	MRCPRT010
Nunc MaxiSorp 96-Well Platten	Thermo Fisher Scientific	44-2404-21
Parafilm	VWR International GmbH	291-1213
Pasteurpipetten	BRAND GmbH + CO KG	7477 20
PCR-Platte, 96-Well, weiß	Analytik Jena AG	844-70038-0
Pipettenspitzen TipOne 10/200/1000 µl	STARLAB INTERNATIONAL GmbH	S1110-3000-C/ S1111-1006-C/ S1111-6001-C
Pipettenspitzen TipOne mit Filter, steril, pyrogenfrei, PCR-rein 10/20/200/1000 µl	STARLAB INTERNATIONAL GmbH	S1121-2710-C/ S1120-1710-C/ S1120-8710-C/ S1126-7710-C
PVDF Membran geringe Fluoreszenz Immobilon-FL (0,45 µm)	Merck	IPFL00005
PVDF Membran geringe Fluoreszenz (0,2 µm)	Thermo Fisher Scientific	22860
Reaktionsgefäß 15/50 ml	Greiner, BioOne GmbH	10711212

Reaktionsgefäße 1,5 ml	VWR International GmbH	211-2161
Reaktionsgefäße PCR-rein, 1,5 ml	Eppendorf AG	0030123328
Reaktionsgefäße pyrogenfrei, 1,5 ml	Eppendorf AG,	0030121589
Reaktionsgefäße, 0,2 ml, 8er Streifen (PCR-rein)	VWR International GmbH	732-0546
FACS Reagenzröhre 5 ml	SARSTEDT AG & Co. KG	551579
Serologische Pipetten 5/10/25 ml	SARSTEDT AG & Co. KG	86.1253.001/ 86.1254.001/ 86.1685.001
Spritze 5/10/20 ml, steril	Carl Roth GmbH + Co. KG	0057.1/ 0058.1/ 0059.1
Sterilfilter 0,2 µm für DMSO	Carl Roth GmbH + Co. KG	KC72.1
Sterilfilter 0,2 µm für wässrige Lösungen	SARSTEDT AG & Co. KG	83.1826.102
Sterilindikatorband	Carl Roth GmbH + Co. KG	XC20.1
V-Boden 96-Well Platte	SARSTEDT AG & Co. KG	82.1583
Vernichtungsbeutel, groß/klein	SARSTEDT AG & Co. KG	86.1200/ 86.1197
Zellkulturflasche 25/75/175 cm ²	SARSTEDT AG & Co. KG	83.3910.002/ 83.3911.002/ 83.3912.002
Zellkulturplatte 6-/24-/96-Well	SARSTEDT AG & Co. KG	83.3920/ 83.3922.005/ 83.3924.005
Zellschaber Größe S	TPP Techno Plastic Products AG	99002

2.1.4 Oligonukleotide

Tabelle 2.4: verwendete Primersequenzen

Primer	Sequenz
GAPDH, vorwärts	5'-CTCTCTgCTCCTCCTgTTCgAC-3'
GAPDH, rückwärts	5'-TGAGCGATGTGGCTCGGCT-3'
IL1B, vorwärts	5'-TGGAGCAACAAGTGGTGT-3'
IL1B, rückwärts	5'-TTGGGATCTACACTCTCCAGC-3'
IL18, vorwärts	5'-TGCCAACTCTGGCTGCTAAA-3'
IL18, rückwärts	5'-TTGTTGCGAGAGGAAGCGAT-3'
PRTN3, vorwärts	5'-GCCGGCCACATAACATTTGC-3'
PRTN3, rückwärts	5'-TACCCGCGTGAAGAAGTCAGG-3'
ELANE, vorwärts	5'-AACGGCTACGACCCCGTAAA-3'
ELANE, rückwärts	5'-CTGCACGTTGGCGTTGATGG-3'
CTSG, vorwärts	5'-GCTGAGGCAGGGGAGATCATCG-3'
CTSG, rückwärts	5'-GGGTGTTTTCCCGTCTCTGGA-3'

2.1.5 Zelllinien

Tabelle 2.5: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Hersteller	Artikelnummer
HEK293 Zellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH	ACC305
HEK Blue IL-1 β Zellen	Invivogen	Hkb.il1b
THP-1 Zellen	DSMZ GmbH	ACC16
THP-1 KO NLRP3 Zellen	Invivogen	thp-konlrp3z
U937 Zellen	Cell lines service (CLS) GmbH	300368

2.1.6 Reagenzien

Tabelle 2.6: Auflistung der verwendeten Reagenzien

Reagenz/ Verbrauchsmaterial	Hersteller	Artikelnummer
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich	M5655
50 bp DNA Leiter	Thermo Fisher Scientific	10416014
A804598	Tocris Bioscience	4473
5-BDBD	Sigma-Aldrich	SML0450-5MG
Ac-YVAD-cmk	Sigma-Aldrich	SML0429-1mg
Acridine Orange	Logos Biosystems	F23002
Adenosintetraphosphat (Ap ₄)	Jena Bioscience	NU-1102-CSTM
Adenosintriphosphat (ATP)	Jena Bioscience	NU-1010-10G
AEBSF	Biomol	50985.100
Agarose	Carl Roth GmbH & Co KG	3810.3
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich	A3678
Annexin V-FITC	BioLegend	640906
Atorvastatin	Tocris Bioscience	3776
Bay 11-7082	Sigma-Aldrich	B5556
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co KG	6943.2
Bovines Serumalbumin (BSA), Albumin Fraktion V Proteasefrei	Carl Roth GmbH & Co KG	T844.4
Buffy-Coat Blutkonserve	Hämatologie des Universitätsklinikums Bonn	
BzATP	Jena Bioscience	NU-1620-25
Calcimycin, A23187	Sigma-Aldrich	C7522

Calciumchlorid	Sigma-Aldrich	793639
Cyan/ Orange Ladepuffer (TrackIt)	Thermo Fisher Scientific	10482028
CytoFLEX Daily QC Fluorespheres	Beckman Coulter	B53230
CyQUANT LDH Zytotoxizitäts-Assay Kit	Thermo FisherScientific	C20300
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich	159220
DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Wasser, steril	Sigma-Aldrich	9610
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), hoher Glukoseanteil (4,5 g/l)	PAN-Biotech GmbH	P04-03500
DNA Plasmid pUNO1-hP2RX7	Invivogen	puno1-hp2rx7
DNA Plasmid pUNO1-mcs	Invivogen	puno1-mcs
Dichtezentrifugationsmedium: Bicol separation medium density 1.007	Biochrom	L6115
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG	4720.1
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	Sigma-Aldrich	D4540
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG	T876.1
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	D-0632
DMEM	Sigma-Aldrich	D6546
DNA Taq Polymerase	Minerva Biolabs GmbH	530050
E64	Merck	324890
ECL-Reagenz Western-Ready Substrate Kit	BioLegend	426302
ECL-Reagenz Western-Clarity	BioRad Laboratories GmbH	1705060
ELISA Kit CXCL8/ IL-8, unbeschichtet	Thermo Fisher Scientific	88-7066-88
ELISA Kit IL-1 β , unbeschichtet	Thermo Fisher Scientific	88-7261-88
ELISA Kit TNF, unbeschichtet	Thermo Fisher Scientific	88-7346-88
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich	32205
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Dinatriumsalz, Dihydrat)	Carl Roth GmbH + Co. KG	8043.1
Fetales Kälberserum	Biochrom	S0615
Fluo-4 AM	AAT Bioquest über Biomol	20552
Fluvastatin	Sigma Aldrich	SML0038-10mg
Gibco OptiMEM, serumfreies Medium, ohne Phenolrot	Thermo Fisher Scientific	11520386
Glukose	Carl Roth GmbH + Co. KG	X997.1
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co. KG	3783.1

Glycin	Carl Roth GmbH + Co. KG	5429.3
HBSS (Hanks' Balanced Salt solution)	Thermo Fisher Scientific	14025092
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich	RDD002
Human TruStain FcX	BioLegend	422302
Hygromycin B Gold	InvivoGen	Ant-hg-1
IGEPAL CA-630	Sigma-Aldrich	I3021
innuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena AG	88-7261-88
innuPREP RNA Mini Kit 2.0	Analytik Jena AG	845-KS-2040250
iScript cDNA Synthese Kit	BioRad Laboratories GmbH	1708891
iTaq Universal SYBR Green Supermix	BioRad Laboratories GmbH	172-5125
Kalibrierlösung pH-Meter	Merck	1990050001
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co KG	P017.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA	104873
Kaliumdihydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co KG	P748.1
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen	G7513
Lämmli-Ladepuffer (4x)	BioRad Laboratories GmbH	1610747
LPS-EB Ultrapure	InvivoGen	tlrl-3pelps
LS-91	Synthetisiert nach Literatur (203) und zur Verfügung gestellt von AG Hansen	
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co KG	T145.3
MCC950 (CRID3)	Tocris Bioscience	5479
MACSplex Cytokine 12 Kit, human	Miltenyl Biotec	130-099-169
Monoklonaler humaner Cleaved-Caspase-1 (Asp297) (D57A2) Antikörper aus dem Kaninchen	Cell signaling	4199S
Monoklonal humaner Cleaved-IL-1 β (D3A3Z) Antikörper aus dem Kaninchen	Cell signaling	83186
Monoklonal humaner HDAC6 (D2E5) Antikörper aus dem Kaninchen	Cell signaling	7558S
Monoklonaler humaner CD11b Antikörper (Klon ICRF44), BV421-konjugiert	BioLegend	301323

Monoklonaler humaner CD11b Antikörper (Klon ICRF44), PE- konjugiert	BioLegend	982606
Monoklonaler humaner CD11c Antikörper (Klon 3.9), PE-konjugiert	BioLegend	301605
Monoklonaler humaner CD14 Antikörper (Klon 63D3), APC/Fire750-konjugiert	BioLegend	367119
Monoklonaler humaner CD86 Antikörper (Klon IT2.2), AlexaFluor647-konjugiert	BioLegend	305415
Monoklonaler humaner P2X7 (E1E8T) Antikörper aus dem Kaninchen	Cell signaling	13809S
Monoklonaler humaner Pro-Caspase-1 (D7F10) Antikörper aus dem Kaninchen	Cell signaling	3866S
Monoklonaler humaner Pro-IL-1 β (D3U3E) Antikörper aus dem Kaninchen	Cell signaling	12703
Monoklonaler humaner β -Aktin Antikörper aus der Maus	Cell signaling	3700S
N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2- diamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co. KG	2367
Natriumchlorid	VWR International GmbH	27810.295
Natriumdeoxycholat Monohydrat	Sigma-Aldrich	D5670
Natriumhydroxid-Lösung 1 M	Th. Geyer GmbH & Co KG	1340-1L
Nigericin	Tocris	4312
Normocin	InvivoGen	Ant-nr-1
oxATP	Merck	5.05758.0001
Pam ₂ CSK ₄	InvivoGen	tlrl-pm2s-1
Pam ₃ CSK ₄	InvivoGen	tlrl-pms
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich	P4333
Pepstatin A	Carl Roth GmbH & Co KG	2936
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich	P1585
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach	P04-36500
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	23225
Pierce LDH Zytotoxizitäts-Test-Kit	Thermo Fisher Scientific	88954

Pluronsäure 20%ig in DMSO	AAT Bioquest über Biomol	20052
Polyklonaler Anti-Kaninchen Antikörper, HRP konjugiert	Cell signaling	7074
Polyklonaler Anti-Maus Antikörper, Starbright blue 700	BioRad Laboratories	12004159
Polyethylenimin (PEI) MAX	Polysciences Inc	24765-100
Poly-L-Lysin Hydrobromid	Sigma-Aldrich	P6282-5MG
PPADS	Tocris Bioscience	0625
Probenecid	Sigma-Aldrich	P8761-25G
Protease/ Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology	5872
Proteinleiter, vorgefärbt (10-245)	AppliChem GmbH	A8889
Pyrogenfreies Wasser für die Zellkultur	Carl Roth GmbH + Co. KG	3255.1
Quanti-Blue SEAP-Detektionslösung	InvivoGen	Rep-qb1, rep-qb2
Reinigungslösung	Beckman Coulter	A64669
Durchflusszytometer FlowClean Cleaning Agent		
RPMI 1640, supplimentiert mit L- Glutamin	Thermo Fisher Scientific	21875091
Salzsäure, konzentriert (37 %)	Carl Roth GmbH + Co. KG	9277.2
SAHA	Synthetisiert nach Literatur (208) und zur Verfügung gestellt von AG Hansen	
Salzsäure 1 M	Thermo Fisher Scientific	15653530
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH + Co. KG	0183.1
SLW118	Synthetisiert nach WO 2020/023480 AI und zur Verfügung gestellt von AG Hansen	
SLW120	Synthetisiert nach Literatur (209) und zur Verfügung gestellt von AG Hansen	
SYBR Safe DNA Gelfarbstoff	Thermo Fisher Scientific	S33102
Taq DNA Polymerase (1 U)	Minerva Biolabs	53-1050
TBS 1 % Casein Blocker	BioRad Laboratories GmbH	1610782
TGX Stain-Free FastCast Acrylamid Kit	BioRad Laboratories GmbH	1610183
Thalidomid	BLDpharm	BD153744 98%

Tiefenreinigungskonzentrat	Beckman Coulter	81911
Durchflusszytometer CONTRAD 70		
Trägerflüssigkeit	Beckman Coulter	B51503
Durchflusszytometrie CytoFLEX		
Shealth Fluid		
Tris(hydroxymethyl)aminomethane- (TRIS-) Hydrochlorid (HCl)	Sigma-Aldrich	T3253
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS)-Base	Carl Roth GmbH + Co. KG	5429
Trypan Blau	Sigma-Aldrich	T6146
TrypLE Express	Thermo Fisher Scientific	12604013
Tubastatin A	Selleck Chemicals LLC	S804906
TWEEN 20	Carl Roth GmbH + Co. KG	9127.1
VenorGeM Classic	Minerva Biolabs GmbH	11-8100
Wasser, PCR-Grad	VWR International GmbH	733-2573
Wasser, PCR rein	Jena Bioscience	PCR-258S
YM-254890	Biomol	AG-CN2-0509
YO-PRO-1 (Oxazol Yellow Iodide)	HelloBio	HB6210
z-VAD-fmk	Invivo Gen	Tlrl-vad
Zeocin	InvivoGen, Toulouse	Ant-zn-1
Zombie Aqua Fixable Viability Kit	BioLegend	423101

2.1.7 Verwendete Lösungen

2.1.7.1 Lösungen zur Zellkultivierung

Für die Herstellung der Polylysin-Lösung wurde Poly-L-Lysin unter der Sterilwerkbank in pyrogenfreiem Wasser gelöst und in 15 ml Röhrengefäße aliquotiert, die bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert wurden.

Tabelle 2.7: Polylysin-Lösung

Polylysin-Lösung	
Poly-L-Lysin Hydrobromid	0,1 mg/ml
	Zusatz zu pyrogenfreiem Wasser
	Lagerung 4 °C

Die Kultivierung von THP-1 Zellen, U937 Zellen und isolierten Monozyten aus humanem Blut erfolgte in komplementiertem RPMI (Roswell Park Memorial Institut) 1640. Dafür wurde das RPMI 1640 Medium durch folgende Zusätze komplementiert, wobei zu beachten ist, dass das verwendete RPMI 1640

schon mit 2 mM L-Glutamin versetzt war. Die Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums erfolgte durch dreißigminütige Inkubation bei 60 °C.

Tabelle 2.8: Komplementiertes RPMI 1640 Medium

Komplementiertes RPMI 1640 Medium	
Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum	10 %
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
	Zusatz zu RPMI 1640 Medium (mit 2 mM Glutamin)
	Lagerung bei 4 °C

Um THP-1 Zellen einzufrieren, wurde dem komplementierten RPMI 1640 Medium DMSO zugesetzt, welches die Kristallbildung an den Zellen verhindert. Das Einfriermedium wurde in 50 ml Röhrengefäßen hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C im Kühlschrank unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Tabelle 2.9: Einfriermedium für THP-1 Monozyten und U937 Monozyten

Einfriermedium für THP-1 Monozyten und U937 Monozyten	
Steriles Dimethylsulfoxid (DMSO)	5 %
	Zusatz zu komplementiertem RPMI 1640 Medium
	Lagerung bei 4 °C unter Lichtausschluss

Um THP-1 und U937 Zellen zu differenzieren, wurde dem komplementierten RPMI 1640 Medium PMA zugesetzt. Das Differenzierungsmedium für THP-1 Zellen und U937 Zellen wurde jeweils frisch hergestellt.

Tabelle 2.10: Differenzierungsmedium für THP-1 Makrophagen

Differenzierungsmedium für THP-1 Makrophagen	
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	25 ng/ml
	Zusatz zu komplementiertem RPMI 1640 Medium

Tabelle 2.11: Differenzierungsmedium für U937 Makrophagen

Differenzierungsmedium für U937 Makrophagen	
PMA	50 ng/ml
	Zusatz zu komplementiertem RPMI 1640 Medium

Zur Kultivierung von THP-1 KO NLRP3 Zellen wurde beim Passagieren abwechselnd Wachstumsmedium und Selektionsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten verwendet. Zur Herstellung des Selektionsmediums wurde dem Wachstumsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten das Selektionsantibiotikum Zeocin zugesetzt. Die genetisch veränderte THP-1 KO NLRP3 Zelllinie besitzt eine Resistenz gegenüber Zeocin, sodass durch den Zusatz von Zeocin Zellen, die eine NLRP3-Aktivität wiedererlangen, absterben. So wird eine positive Selektion der THP-1 Monozyten mit einem Knockout für NLRP3 gewährleistet. Die Medien wurden hergestellt und konnten bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 2.12: Wachstumsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten

Wachstumsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten	
HEPES	25 mM
Normocin	100 µg/ml
	Zusatz zu komplementiertem RPMI 1640 Medium
	Lagerung bei 4 °C

Tabelle 2.13: Selektionsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten

Selektionsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten	
Zeocin	100 µg/ml
	Zusatz zu Wachstumsmedium für THP-1 KO NLRP3 Makrophagen
	Lagerung bei 4 °C

Als Einfriermedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten wurde hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum mit DMSO versetzt. Das Einfriermedium wurde in 50 ml Röhrengefäßen hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

Tabelle 2.14: Einfriermedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten

Einfriermedium für THP-1 Monozyten und U937 Monozyten	
Steriles DMSO	5 %
	Zusatz zu hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum
	Lagerung bei 4 °C unter Lichtausschluss

Tabelle 2.15: Stimulationsmedium für THP-1 KO NLRP3 Zellen

Stimulationsmedium für THP-1 KO NLRP3 Zellen	
HEPES	25 mM Zusatz zu komplementiertem RPMI 1640 Medium Lagerung bei 4 °C

Um THP-1 KO NLRP3 Zellen zu differenzieren, wurde dem Stimulationsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten PMA zugesetzt. Das Differenzierungsmedium wurde jeweils frisch hergestellt.

Tabelle 2.16: Differenzierungsmedium für THP-1 KO NLRP3 Makrophagen

Stimulationsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten	
PMA	25 ng/ml Zusatz zu Stimulationsmedium für THP-1 KO NLRP3 Zellen

Für die Isolation von peripheren mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) aus Buffycoat-Blut wurde steriles PBS nach Dulbecco ohne Magnesium und Calciumionen verwendet, das zusätzlich mit EDTA versetzt wurde. EDTA ist ein Komplexbildner für mehrwertige Kationen und verhindert dadurch die Blutgerinnung. EDTA wurde in 10 ml PBS gelöst und anschließend sterilfiltriert, bevor es der restlichen Menge PBS hinzugefügt wurde.

Tabelle 2.17: PBS mit EDTA

PBS mit EDTA	
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Natriumsalz	2 mM Zusatz zu PBS sterilfiltrieren mit 0,22 µM Filter, Lagerung -4 °C

Für die Kultivierung von HEK293 und HEK Blue IL-1 β Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 4,5 g/ml Glukoseanteil verwendet.

Tabelle 2.18: Wachstums- und Stimulationsmedium für HEK293 Zellen

Wachstums- und Stimulationsmedium für HEK293 Zellen	
Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum	10 %
L-Glutamin	2 mM
	Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)
	Lagerung bei 4 °C

Tabelle 2.19: Einfriermedium für HEK293 Zellen

Einfriermedium für HEK293 Zellen	
Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum	20 %
DMSO	10 %
L-Glutamin	2 mM
	Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)
	Lagerung bei 4 °C unter Lichtausschluss

Für die Transfektion der HEK293 Zellen musste zunächst Polyethylenimin-Lösung in einem 50 ml Röhrengefäß hergestellt werden. Dazu wurde PEI MAX in einer Teilmenge pyrogenfreiem Wasser gelöst und anschließend der pH-Wert mit einem Indikatorpapier und Natriumhydroxidlösung auf pH 7 eingestellt. Anschließend wurde pyrogenfreies Wasser dazugegeben, sodass eine Endkonzentration von 1 mg/ml erhalten wurde. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.20: PEI-Lösung

PEI-Lösung	
PEI MAX	1 mg/ml
Natriumhydroxidlösung 1 M	pH 7
	Zusatz zu pyrogenfreiem Wasser
	Sterilfiltrieren, Lagerung bei 4 °C

Tabelle 2.21: Transfektionsmedium für HEK293 Zellen

Transfektionsmedium für HEK Blue IL-1β Zellen	
Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum	5 %
L-Glutamin	2 mM
	Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)

Für Stimulationsversuche in HEK Blue IL-1 β Zellen wurde Basalmedium verwendet.

Tabelle 2.22: Basalmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen

Basalmedium für HEK Blue IL-1β Zellen	
Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum	10 %
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
	Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)

HEK Blue IL-1 β Zellen sind resistent gegenüber Hygromycin Gold B und Zeocin. Für die Kultivierung der HEK Blue IL-1 β Zellen wurde dem Basalmedium deshalb verschiedene Selektionsantibiotika zugesetzt.

Tabelle 2.23: Selektionsmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen

Selektionsmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen	
Normocin	100 μ g/ml
Hygromycin B Gold	200 μ g/ml
Zeocin	100 μ g/ml
Zusatz zu Basalmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen.	

Tabelle 2.24: Einfriermedium für HEK Blue IL-1 β Zellen

Einfriermedium für HEK Blue IL-1 β Zellen	
Hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum	20 %
DMSO	10 %
L-Glutamin	2 mM
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 μ g/ml
Zusatz zu DMEM (4,5 g/l Glukose)	
Lagerung bei 4 °C unter Lichtausschluss	

2.1.7.2 Lösungen für den Mykoplasmentest

Für den Mykoplasmen-Test wurde ein 5x konzentrierter TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer hergestellt, der bis zur Verwendung bei Raumtemperatur gelagert werden konnte. Zur Durchführung des Mykoplasmen-Tests wurde der Puffer dann 1:5 verdünnt. Um den TBA-Puffer herzustellen, erfolgte zunächst die Herstellung einer 0,5 M Natrium-EDTA-Lösung. Der pH-Wert wurde mit Natriumhydroxid-Lösung auf 8,0 eingestellt. Sobald der pH-Wert richtig eingestellt war, wurde die Lösung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

Tabelle 2.25: 0,5 M Natrium-EDTA-Lösung

0,5 M Natrium-EDTA-Lösung	
EDTA, Dinatriumsalz, Dihydrat	0,5 M
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	Nach Bedarf pH 8
Autoklavieren, Lagerung bei RT	

Tabelle 2.26: TBE-Puffer (5x konzentriert)

TBE-Puffer (5x konzentriert)	
TRIS-Base	108 g
Borsäure	55 g
0,5 M Natrium EDTA-Lösung (pH 8)	40 ml
Destilliertes Wasser	1960 ml
	Lagerung bei RT

Für die PCR Reaktion des Mykoplasmen-Tests wurde ein Master-Mix hergestellt. Dazu wurden Primer und Reagenzien der Firma MB Miverva Biolabs verwendet (*Venor®GeM Classic Kit*). Für den Test wurden zuerst die benötigten Reagenzien nach Herstellungsanweisung aufgetaut und wenn nötig rekonstituiert. Anschließend wurde ein Master-Mix aus Reaktionspuffer, Primer/Nukleotid Mix und interner Kontrolle hergestellt.

Tabelle 2.27: Master-Mix für Mykoplasmen-Test

Reagenz	Volumen (µl)/Probe
Wasser (PCR-Grad)	14,5
Reaktionspuffer (10x)	2,5
Primer/Nukleotid Mix	1,25
Interne Kontrolle	2,5
Taq DNA Polymerase (1 Unit)	1

Tabelle 2.28: Agarosegel für Mykoplasmentest

Agarosegel für Mykoplasmentest	Menge/Gel
Agarose	0,45 g
TBE-Puffer (1x)	30 ml
SYBR Green Stain	3 µl

2.1.7.3 Stocklösungen für Stimulationsversuche

Für Stimulationsversuche wurden die Zellen mit verschiedenen Stimulanzen und Inhibitoren behandelt. Dafür wurden Stocklösungen der verwendeten Reagenzien mit den in Tabelle 2.29 aufgeführten Konzentrationen unter Verwendung des jeweiligen Lösungsmittels hergestellt. Die Herstellung erfolgte unter der Sterilwerkbank. Im Anschluss wurden die gelösten Reagenzien sterilfiltriert und entsprechend bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 2.29: Stocklösungen von Stimulationsreagenzien und Inhibitoren

Reagenz	Lösungsmittel	Konzentration	Lagerung
5-BDBD	DMSO	25 mM	-20 °C
A804598	DMSO	10 mM	-20 °C
Ac-YVAD-cmk	DMSO	10 mM	-20 °C
AEBSF	Pyrogenfreies Wasser	100 mM	-20 °C
Ap4	pyrogenfreies Wasser mit Tris-Base auf pH 7 eingestellt	200 mM	-80 °C
ATP	pyrogenfreies Wasser mit Tris-Base auf pH 7 eingestellt (siehe unten)	200 mM	-80 °C
Atorvastatin	DMSO	20 mM	-20 °C
Bay 11-7082	DMSO	20 mM	-20 °C
BzATP	Pyrogenfreies Wasser	30 mM	-80 °C
Calcimycin	DMSO	10 mM	-20 °C
E64	Pyrogenfreies Wasser	10 mM	-20 °C
Fluvastatin	Pyrogenfreies Wasser	10 mM	-20 °C
Fluo-4 AM	DMSO	1 mM	-20 °C
Kaliumchlorid	Zellkulturmedium	3 M	frisch hergestellt
LPS	Pyrogenfreies Wasser	5 mg/ml	-20 °C
LS-91	DMSO	10 mM	-20 °C
MCC950	DMSO	5 mM	-20 °C
Nigericin	Ethanol	10 mM	-20 °C
oxATP	Pyrogenfreies Wasser	30 mM	-20 °C
Pam ₂ CSK ₄	Pyrogenfreies Wasser	1 mg/ml	-20 °C
Pam ₃ CSK ₄	Pyrogenfreies Wasser	1 mg/ml	-20 °C
Pepstatin A	DMSO	10 mM	-20 °C
PMA	DMSO	1 mg/ml	-20 °C
PPADS	Pyrogenfreies Wasser	10 mM	-20 °C
Probenecid	DMSO	100 mM	-20 °C
SAHA	DMSO	10 mM	-20 °C
SLW118	DMSO	10 mM	-20 °C
SLW120	DMSO	10 mM	-20 °C
Thalidomid	DMSO	10 mM	-20 °C
Tubastatin A	DMSO	10 mM	-20 °C
YM-254890	DMSO	1 mM	-20 °C
YO-PRO-1	DMSO	1 mM	-20 °C
z-VAD-fmk	DMSO	20 mM	-20 °C

Herstellung der ATP- und Ap4-Stocklösung:

Die ATP und Ap4 Stocklösungen mussten mit Tris-Base auf einen finalen pH-Wert von 7 eingestellt werden. Dazu wurde zunächst Tris-Base 1 M hergestellt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit Hilfe eines Indikatorpapiers überprüft. Die Lösung konnte bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 2.30: Tris-Base 1 M

Tris-Base 1 M	
Tris-Base	1 M Zusatz zu pyrogenfreiem Wasser pH-Wert zw. 10 bis 11 Lagerung 4 °C

Bei Lagerung von ATP und Ap4 als Feststoffen kann es zu Veränderungen des gebundenen Kristallwassers kommen. Daher ist die genaue Molare Masse unbekannt und zur Herstellung einer Lösung mit einer bestimmten Konzentration muss die tatsächliche Konzentration mittels UV/Vis-Spektroskopie ermittelt werden. Zur Herstellung von ATP und Ap4 werden die Feststoffe zunächst in einer Teilmenge pyrogenfreiem Wasser gelöst und mit Tris-Base 1 M mittels Indikatorpapiers auf pH 7 eingestellt. Anschließend wird die tatsächliche Konzentration der Lösung mittels UV/Vis Spektroskopie ermittelt. Damit die Absorption der hergestellten Lösungen zwischen 0,1 und 1 liegt, wurden entsprechende Verdünnungen der Lösungen hergestellt (ca. 20 µM-Lösung). Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 259 nm gemessen und anhand des Extinktionskoeffizienten von 15,1 L/(mmol*cm) konnte die tatsächliche Konzentration auf Grundlage des Lambert-Beerschen-Gesetzes ermittelt werden. Es wurden 3 Messungen durchgeführt und die Mittelwerte gebildet. Aus den ermittelten Ist-Konzentrationen konnte im Anschluss die gewünschte 200 mM Stocklösung hergestellt werden. Dazu wurde ein definiertes Volumen aus der hergestellten Lösung entnommen und mit pyrogenfreiem Wasser gemischt, sodass eine Endkonzentration von 200 mM erhalten wurde. Die Lösung wurde gevortext, sterilfiltriert und aliquotiert. Die Aliquots wurden bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.1.7.4 Lösungen für den SEAP-Reporter-Test

Beim SEAP-Reporter-Test wird die SEAP (sekretierte embryonale alkalische Phosphatase) Produktion der Reporterzellen durch Zugabe eines speziellen Substrats gemessen. Hierfür wurde die QUANTI-blue Substratlösung hergestellt. Dazu wurde QUANTI-blue Reagenz mit QUANTI-blue Puffer in pyrogenfreiem Wasser gemischt. Die Lösung wurde bis zur Verwendung unter Lichtausschluss bei 4 °C maximal 4 Wochen gelagert werden.

Tabelle 2.31: QUANTI-blue Substratlösung

QUANTI-blue Substratlösung	
QUANTI-blue Reagenz	1 ml
QUANTI-blue Puffer	1 ml
Pyrogenfreies Wasser	98 ml
	Lagerung: 4 °C, maximal 4 Wochen

2.1.7.5 Lösungen für die Durchflusszytometrie

Tabelle 2.32: FACS-Puffer

FACS-Puffer	
BSA	0,5 %
	Zusatz zu PBS mit EDTA

Für die Durchführung der YO-PRO-Färbung wurde ein YO-PRO-Puffer hergestellt (Tabelle 2.33). Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung sterilfiltriert.

Tabelle 2.33: YO-PRO-Puffer

YO-PRO-Assay-Puffer	
Natriumchlorid	147 mM
HEPES	10 mM
Glukose	13 mM
Kaliumchlorid	2 mM
Calciumchlorid	0,1 mM
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	pH 7,4
	Zusatz zu doppelt destilliertem Wasser
	Sterilfiltrieren, Lagerung: 4 °C

2.1.7.6 Lösungen für Zellviabilitätstests

Da die Bindung von Annexin V-FITC an Phosphatidylserin calciumabhängig ist und Zombie Aqua nicht mit BSA-haltigen Puffern verwendet werden darf, konnte für die Messung kein FACS-Puffer verwendet werden. Für den Annexin V/Zombie Aqua-Test wurde ein Annexin-Bindungspuffer hergestellt (Tabelle 2.34). Die Lösung wurde sterilfiltriert und in einem 50 ml Röhrengefäß bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.34: Annexin V-Bindungspuffer

Annexin V-Bindungspuffe	
HEPES	0,1 mg/ml
Natriumchlorid	140 mM
Calciumchlorid	2,5 mM
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	pH 7,4
	Zusatz zu doppelt destilliertem Wasser
	Sterilfiltrieren, Lagerung 4 °C

Für den MTT-Test wurde MTT in sterilem PBS gelöst und sterilfiltriert. Die Lösung wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und unter Lichtausschluss bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.35: MTT-Lösung

MTT-Lösung	
MTT	5 mg/ml
	Zusatz zu sterilem PBS
	Sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C

Für den LDH-Test wurde das CyQUANT LDH Zytotoxizitäts-Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Um den LDH-Reaktionsmix herzustellen, wurden zunächst das lyophilisierte Substrat aufgetaut und mit 11,4 ml doppelt demineralisiertem Wasser gemischt. Anschließend konnte der LDH-Reaktionsmix in einem 15 ml Röhrengefäß hergestellt werden. Die Lösung wurde direkt verwendet oder bei -20 °C unter Lichtausschluss eingefroren. Nach Einfrieren konnte die Lösung 3 Mal aufgetaut und wiederverwendet werden, bevor sie verworfen wurde.

Tabelle 2.36: LDH-Reaktionsmix

LDH-Reaktionsmix	
Substrat Mix in Wasser	11,4 ml
Test-Puffer	0,6 ml
	Lagerung bei -20 °C unter Lichtausschluss
	Maximale Verwendung: 3 Mal

2.1.7.7 Lösungen für die ELISA Analytik

Zur ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)-Analytik wurden Test-Kits der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Bis auf den ELISA-Waschpuffer und die ELISA-Stopp-Lösung waren sämtliche benötigte Reagenzien im Kit selbst enthalten.

Die 96-Well Platte musste zwischen den einzelnen Inkubationsschritten mit ELISA-Waschpuffer gewaschen werden. Dafür wurde zunächst PBS hergestellt. Hierfür wurden die in Tabelle 2.37 gezeigten Komponenten in 5 l demineralisiertem Wasser in einem Messkolben gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt und die Lösung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.37: PBS für ELISA

PBS für ELISA	
Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Dinatriumhydrogencarbonat	8,1 mM
Kaliumdihydrogencarbonat	1,5 mM
	pH 7,2 - 7,4
	In doppelt destilliertem Wasser
	Lagerung 4 °C

Für den ELISA-Waschpuffer wurde TWEEN-20 in PBS für ELISA in 1 l Flaschen gelöst und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.38: ELISA-Waschpuffer

ELISA-Waschpuffer	
TWEEN-20	0,05 %
	In PBS für ELISA
	Lagerung 4 °C

Die enzymatische Reaktion des ELISA wurde mit saurer ELISA-Stopp-Lösung beendet. Hierfür wurde eine verdünnte Salzsäure-Lösung hergestellt, die bei Raumtemperatur gelagert wurde.

Tabelle 2.39: ELISA-Stopp-Lösung

ELISA-Stopp-Lösung	
Salzsäure	1 N
	In doppelt demineralisiertem Wasser
	Lagerung Raumtemperatur

2.1.7.8 Lösungen für die Western Blot Analytik

Damit der RIPA-Basalpuffer (Tabelle 2.44) hergestellt werden konnte, mussten zunächst die im RIPA-Basalpuffer enthaltenen Komponenten hergestellt werden. Die Lösungen wurden wie in den folgenden Tabellen beschrieben hergestellt und konnten bei 4 °C gelagert werden.

Tabelle 2.40: TRIS-HCl Lösung (1M)

TRIS-HCl-Lösung (1 M)	
Salzsäure	6,005 g
Doppelt demineralisiertes Wasser	50 ml
Natriumhydroxid-Lösung (1 M)	pH 7,4
	Lagerung 4 °C

Tabelle 2.41: Natriumdeoxycholat-Lösung (10 %)

Natriumdeoxycholat-Lösung (10 %)	
Natriumdeoxycholat	5 g
Doppelt demineralisiertes Wasser	50 ml
	Lagerung 4 °C

Tabelle 2.42: Natriumchlorid-Lösung (10 %)

Natriumchlorid-Lösung (10 %)	
Natriumchlorid	5 g
Doppelt demineralisiertes Wasser	50 ml
	Lagerung 4 °C

Tabelle 2.43: EDTA-Lösung (50 mM)

EDTA-Lösung (50 mM)	
EDTA, Dinatriumsalz, Dihydrat	930,6 g
Doppelt demineralisiertes Wasser	50 ml
	Lagerung 4 °C

Tabelle 2.44: RIPA-Basalpuffer

RIPA-Basalpuffer	
TRIS-HCl-Lösung (1 M)	2,5 ml
IGEPAL CA-630	0,5 ml
Natriumdesoxycholat (10 %)	1,25 ml
Natriumchlorid-Lösung (5 M)	1,5 ml
EDTA-Lösung (50 mM)	1 ml
Doppelt demineralisiertes Wasser	42,75 ml
	Lagerung 4 °C

Zur Zellyse wurde der RIPA-Basalpuffer mit Protease-Phosphatase Inhibitor versetzt. Pro Well wurden 50 µl benötigt. Die Gesamtmenge, die für alle Proben benötigt wurde, wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß als Mastermix frisch hergestellt.

Tabelle 2.45: RIPA-Puffer

RIPA-Puffer	Volumen (µl)/Probe
RIPA-Basalpuffer	49,5 µl
Protease/Phosphatase Inhibitor (100x)	0,5 µl

Damit die Proteine denaturieren, wurde Lämmli Ladepuffer DL-Dithiothreitol (DTT)-Lösung zugesetzt, das die Disulfidbrücken der Proteine spaltet. Dafür wurde zunächst in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß die 40-fach konzentrierte DTT-Lösung hergestellt, die bei -20 °C gelagert werden konnte. Für die Probenvorbereitung wurde schließlich die Probe mit DTT/Lämmli-Mix gemischt. Der DTT Lämmli-Mix wurde wie in Tabelle 2.47 hergestellt und später mit der Probe gemischt (1 Teil Probe mit 3 Teilen DTT/Lämmli-Mix).

Tabelle 2.46: DTT-Lösung (40x)

DTT-Lösung	
DL-Dithiothreitol (DTT)	257 mg
Doppelt demineralisiertes Wasser	1 ml
	Lagerung -20 °C

Tabelle 2.47: DTT/Lämmli-Mix

DTT/Lämmli-Mix	
Lämmli (4x)	9 Teile
DTT-Lösung (40x)	1 Teil

Die Gele für die Gelelektrophorese wurden mit Hilfe des TGX Stain-Free FastCast Acrylamid Kit in einer Konzentration von 10 % hergestellt. Die dafür benötigte 10%ige APS-Lösung wurde in demineralisiertem Wasser in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß hergestellt und konnte bei -20 °C gelagert werden. Insgesamt konnte die hergestellte APS-Lösung 3 Mal wiederverwendet werden.

Um die Gele zu gießen, wurde die Mini Protean Tetra Cell Einheit der Firma BioRad benutzt. Zuerst wurden pro Gel 5 ml des Laufgels (Tabelle 2.49) mit einer serologischen Pipette möglichst blasenfrei zwischen die Glasplatten gegeben. Die Lösung wurde im Anschluss mit 1 ml Isopropanol überschichtet und für 30 Minuten inkubiert, bis das Gel fest geworden war. Das Isopropanol wurde entfernt und das auspolymerisierte Laufgel mit Sammelgel (Tabelle 2.50) überschichtet. Anschließend wurde der Kamm zwischen die Glasplatten gesteckt und das Gel weitere 30 Minuten inkubiert, bis es vollständig

polymerisiert war. Nachdem die Gele erstarrt waren, wurden diese entweder direkt verwendet oder bei 4° C in einem feuchten Tuch gelagert.

Tabelle 2.48: APS-Lösung 10 %

APS-Lösung 10 %	
APS	50 mg
Demineralisiertes Wasser	500 µl
	Lagerung -20 °C, unter Lichtausschluss

Tabelle 2.49: Laufgel (10 % Polyacrylamid Gel)

Laufgel (10 % Polyacrylamid Gel)	Menge pro Gel
Resolver A	2,5 ml
Resolver B	2,5 ml
TEMED	2,5 ml
APS-Lösung 10 %	25 µl

Tabelle 2.50: Sammelgel

Sammelgel	Menge pro Gel
Stacker A	1 ml
Stacker B	1 ml
TEMED	2 µl
APS-Lösung 10 %	10 µl

Der verwendete Laufpuffer, der Transfer-Puffer und der TBS-Puffer wurden in 10-facher Konzentration hergestellt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert. Bei Bedarf wurde die gewünschte 1-fache Konzentration durch Verdünnung der Stammlösung 1:10 mit demineralisiertem Wasser hergestellt und der pH-Wert nochmals überprüft und ggf. mit NaOH oder HCl-Lösung angepasst. Die pH-Werte der 1-fach konzentrierten Puffer sind in den Tabellen angegeben.

Tabelle 2.51: Laufpuffer für die Elektrophorese (10x)

Laufpuffer für die Elektrophorese (10x)	
Tris-Base	30,2 g
Glycin	144 g
SDS	10 g
Demineralisiertes Wasser	1000 ml
	Lagerung 4 °C

Tabelle 2.52: Laufpuffer für die Elektrophorese (1x)

Laufpuffer für die Elektrophorese (1x)	
Laufpuffer für die Elektrophorese (10x)	100 ml
Demineralisiertes Wasser	900 ml
	Lagerung 4 °C
	pH-Wert 8,3 – 8,6

Tabelle 2.53: Transfer-Puffer (10x)

Transfer-Puffer (10x)	
Tris-Base	30 g
Glycin	144 g
Demineralisiertes Wasser	1000 ml
	Lagerung 4 °C

Tabelle 2.54: Transfer-Puffer (1x)

Transfer-Puffer (1x)	
Transfer-Puffer (10x)	100 ml
Demineralisiertes Wasser	900 ml
	Lagerung 4 °C
	pH-Wert 8,3

Tabelle 2.55: TBS-Puffer (10x)

TBS-Puffer (10x)	
Tris-HCl	12,144 g
Natriumchlorid	87,66 g
Demineralisiertes Wasser	1000 ml
	Lagerung 4 °C

Tabelle 2.56: TBS-Puffer (1x)

TBS-Puffer (1x)	
TBS-Puffer (10x)	100 ml
Demineralisiertes Wasser	900 ml
	Lagerung 4 °C

Zur Herstellung des TBS-T-Puffers, wurde TBS-Puffer mit TWEEN-20 versetzt und der pH-Wert auf 8 eingestellt.

Tabelle 2.57: TBS-T-Puffer

TBS-T-Puffer	
TBS-Puffer	100 ml
TWEEN-20	1 ml
Demineralisiertes Wasser	ad 1000 ml
Natriumhydroxid-Lösung	pH 8

Zum Blockieren der Membran wurde 5 % Milch in TBS-T verwendet. Die Primärantikörper wurden dann wie in Tabelle 2.59 angegeben entweder in 5 % Milch in TBS-T oder 5 % BSA in TBS-T hergestellt. Der Fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper wurde in speziellem Fluoreszenz-Puffer (Tabelle 2.60) hergestellt, der SDS enthielt.

Tabelle 2.58: 5 % Milch in TBS-T

5 % Milch in TBS-T	
Magermilchpulver	5 %
	Zusatz zu TBS-T-Puffer

Tabelle 2.59: 5 % BSA in TBS-T

5 % BSA in TBS-T	
BSA	5 %
	Zusatz zu TBS-T-Puffer

Tabelle 2.60: Puffer für Fluoreszenzantikörper

Puffer für Fluoreszenzantikörper	
SDS	0,02 %
	Zusatz zu TBS 1 % Casein Puffer

Tabelle 2.61: Auflistung der benutzten Antikörper für den Western Blot und die dazugehörige Verdünnung

Antikörper	Verdünnung	Verdünnungsmittel
HDAC6 Antikörper, Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBS-T
P2X7 Antikörper, Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBS-T
Pro-IL-1 β Antikörper, Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBS-T
Cleaved-IL-1 β Antikörper, Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBS-T
Pro-Caspase-1 Antikörper, Kaninchen	1:1000	5 % Milch in TBS-T
Cleaved-Caspase-1 Antikörper, Kaninchen	1:1000	5 % BSA in TBS-T
β -Aktin Antikörper, Maus	1:2000	5 % BSA in TBS-T
Anti-Kaninchen Antikörper, HRP konjugiert	1:2000	5 % Milch in TBS-T
Anti-Maus Antikörper, Starbright blue 700	1:10000	Puffer für Fluoreszenzantikörper

2.1.7.9 Lösungen für PCR-Analytik

Für die RNA-Isolation wurde 70%ige Ethanol-Lösung verwendet, die in DEPC-Wasser hergestellt wurde. DEPC wandelt Histidinreste in Proteinen zu Carboethoxyhistidin um und macht RNase und DNasen dadurch unschädlich. Verwendete Glaswaren wurden mit DEPC-Wasser (Tabelle 2.62) behandelt und im Anschluss autoklaviert.

Tabelle 2.62: DEPC-Wasser

DEPC-Wasser	
DEPC	0,1 % Zusatz zu doppelt demineralisiertem Wasser Lagerung bei RT

Tabelle 2.63: 70%iger Ethanol in DEPC-Wasser

70 %-Ethanol in DEPC-Wasser	
Ethanol absolut	70 % (m/m) Zusatz zu autoklaviertem DEPC-Wasser Lagerung bei RT

2.1.7.10 Lösungen für den Calciumflux-Test

Um den Calcium-Waschpuffer herzustellen, musste zuerst Hank's balanced salt solution (HBSS) mit 20 mM HEPES und eine Probenecid Stocklösung hergestellt werden. Für die HBSS + HEPES Pufferlösung wurde HEPES zu 500 ml HBSS gegeben, sodass eine Konzentration von 20 mM HEPES erhalten wurde. Die Flasche konnte bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert werden. Um eine Probenecid

Stocklösung herzustellen, wurde Probenecid in DMSO gelöst, sodass eine Konzentration von 100 mM entstand. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2.64: HBSS + HEPES Pufferlösung

HBSS + HEPES Pufferlösung	
HEPES (1 M)	20 mM Zusatz zu HBSS Lagerung 4 °C

Durch Zugabe von Probenecid wird der Calciumtransport aus der Zelle heraus verhindert. Der Waschpuffer für den Calcium-Test wurde immer frisch am Versuchstag in 50 ml Röhrengefäßen hergestellt.

Tabelle 2.65: Calcium-Waschpuffer

Calcium-Waschpuffer	
Probenecidlösung (100 mM)	1 mM Zusatz zu HBSS + HEPES Pufferlösung

Um die Farbstoffaufnahme in die Zelle zu erleichtern, wurde ein Farbstoffladepuffer mit Pluronsäure verwendet. Der Farbstoffladepuffer wurde immer frisch in einem 15 ml Röhrengefäß hergestellt und unter Lichtausschluss gelagert.

Tabelle 2.66: Farbstoffladepuffer

Farbstoffladepuffer	
Fluo-4 AM	3 µM
Pluronsäure (20%ig)	0,05 % Zusatz zu Calcium-Waschpuffer

2.2 Zellkultur

Die Kultivierung aller verwendeten Zellen erfolgte stets im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und mindestens 95 % Luftfeuchte. Alle Experimente wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Verbrauchsmaterialien, die in Berührung mit den lebenden Zellen gekommen sind, waren – wenn möglich – steril und pyrogenfrei.

2.2.1 Beschichtung der Zellkulturplatten mit Polylysin

Für ausgewählte Experimente wurden Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät, die zuvor mit Polylysin-Lösung (Tabelle 2.7) beschichtet wurden. Selbst wenn es sich bei den verwendeten Zelllinien um adhärenente Zellen handelt, besteht die Möglichkeit, dass vermehrt Zellen während des Waschvorgangs oder des Mediumwechsels abgesaugt werden, da die Adhärenz der Zellen manchmal zu schwach ist. Durch die Beschichtung der Platten mit Polylysin wurde die Zelladhärenz verbessert und der Zellverlust während des Experiments verringert. Die Polylysin-Lösung wurde unter sterilen Bedingungen in die Vertiefungen der Zellkulturplatten gegeben. Die Platten wurden dann verschlossen für 5 Minuten auf einem Schüttler inkubiert, bevor die Polylysin-Lösung abgesaugt und die Platten mit pyrogenfreiem Wasser gewaschen wurden. Danach wurde die offenen Platten für mindestens 2 Stunden unter der Sterilwerkbank getrocknet und anschließend verschlossen bei 4 °C gelagert, bis sie für die weitere Verwendung bereit war.

Tabelle 2.67: Volumina für die Beschichtung der Zellkulturplatten mit Polylysin-Lösung

Plattentyp	Polylysin-Lösung	Pyrogenfreies Wasser
24-Well	100 µl	500 µl
96-Well	42 µl	100 µl

2.2.2 THP-1 Monozyten und Makrophagen

Bei THP-1 Zellen handelt es sich um eine humane monozytäre Zelllinie, die in der medizinischen Forschung häufig zur Untersuchung des Immunsystems und der Entzündungsreaktionen verwendet wird. Die Zellen wurden aus dem peripheren Blut eines männlichen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie isoliert und können *in vitro* in makrophagenähnliche Zellen differenziert werden. THP-1 Monozyten liegen als Suspensionszellen vor und wurden von Passage 2 bis 25 verwendet. Die aus den THP-1 Monozyten differenzierten makrophagenähnlichen THP-1 Zellen sind adhärenent und werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit als THP-1 Makrophagen betitelt.

2.2.2.1 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von THP-1 Monozyten

Die THP-1 Monozyten wurden in komplementiertem RPMI 1640 Medium (Tabelle 2.8) bei einer Zellzahl von 0,1 bis 1 Millionen Zellen pro Milliliter kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage wurde das Zellkulturmedium gewechselt und die Zellen passagiert. Um die Zellen zu passagieren, wurde zunächst der Inhalt der Zellkulturflasche in ein 50 ml Röhrengefäß überführt und gut durchgemischt. Mithilfe eines Zellzählgeräts (Luna fl) wurde die Zellzahl bestimmt. Die benötigte Zellzahl wurde dann in ein neues 50 ml Röhrengefäß überführt und anschließend für 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Danach wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt. Zum verbliebenen Zellpellet wurde frisches komplementiertes RPMI 1640 Medium zugefügt, sodass eine Zellkonzentration von 0,1 Millionen Zellen pro Milliliter erhalten wurde. Diese Suspension wurde gut durchmischt und anschließend in Zellkulturflaschen überführt, die bei 37 °C im Brutschrank kultiviert wurden. Zum Einfrieren wurden 3 bis 5 Millionen Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium für THP-1 Zellen (Tabelle 2.9) suspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in eine mit 100%igem Isopropanol gefüllten Einfrierbox überführt und zunächst 24 Stunden in der Einfrierbox bei -80 °C schonend heruntergekühlt und daraufhin in einen Stickstofftank überführt. Die Einfrierboxen konnten insgesamt 5 Mal verwendet werden, bevor das darin enthaltene 100%ige Isopropanol gewechselt werden musste. Um die Zellen nach der Lagerung im Stickstofftank aufzutauen, wurden die Kryoröhrchen kurz ins Wasserbad bei 37 °C gegeben, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Danach wurde die Zellsuspension in ein mit 10 ml komplementiertem RPMI 1640 Medium befülltem 15 ml Röhrengefäß überführt. Nach der Zentrifugation wurde das alte Medium abgesaugt. Das Zellpellet, das aus 3 bis 5 Millionen Zellen bestand, wurde in 20 ml frisches komplementiertes RPMI 1640 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt und 4 Tage im Brutschrank bei 37 °C gelagert, bevor erneut passagiert wurde. Bevor die THP-1 Monozyten verwendet wurden, wurden sie 2 Mal passagiert.

2.2.2.2 Differenzierung von THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen

Um THP-1 Monozyten zu THP-1 Makrophagen zu differenzieren, wurden die Zellen mithilfe eines Zellzählgeräts (Luna fl) gezählt und die gewünschte Zellzahl in ein 25 ml Röhrengefäß überführt. Nach Zentrifugation wurde das alte Medium abgesaugt und frisch hergestelltes Differenzierungsmedium (Tabelle 2.10) hinzugegeben, sodass eine Zellkonzentration von 0,4 Millionen Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Die Zellsuspension wurde in 6-, 24- oder 96-Well Platten ausgesät (jeweilige Volumina siehe Tabelle 2.68) und anschließend wurden die Platten für 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C gelagert. Durch das PMA-haltige Differenzierungsmedium wurden die THP-1 Zellen adhärent, sodass nach 48 Stunden, der Überstand einfach abgesaugt werden konnte. Die Zellen wurden mit warmen PBS gewaschen, bevor PMA-freies komplementiertes RPMI 1640 zugefügt wurde. Nach Ablauf von 24 Stunden Inkubationszeit konnten die ausdifferenzierten THP-1 Makrophagen für weitere Experimente verwendet werden.

Tabelle 2.68: Verwendete Zellsuspensionsvolumina zum Einsäen von THP-1 Zellen

Plattenart	Volumina der Zellsuspension
6-Well	2 ml
24-Well	1 ml
96-Well	0,1 ml

2.2.3 THP-1 KO NLRP3 Monozyten und Makrophagen

THP-1 KO NLRP3 Zellen wurden aus der humanen monozytären THP-1 Zelllinie durch Deletion der N-terminalen Region des NLRP3-Gens gewonnen. Es wird nur ein inaktives C-terminales NLRP3-Fragment exprimiert (210). Daher sind THP-1 KO NLRP3-Zellen geeignet, um die Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung durch verschiedene Stimuli vom NLRP3-Inflammasom zu untersuchen.

Die THP-1 KO Monozyten wurden von der Firma Invivogen erworben und wurden bis Passage 20 verwendet.

2.2.3.1 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von THP-1 KO Makrophagen

Die THP-1 KO NLRP3 Monozyten wurden bei einer Zellzahl von 0,5 bis 2 Millionen Zellen pro Milliliter kultiviert und alle 3 bis 4 Tage passagiert. Dabei erfolgte die Kultivierung abwechselnd in Wachstumsmedium (Tabelle 2.12) und Selektionsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten (Tabelle 2.13).

Um die Zellen zu passagieren, wurden die Zellen zunächst mit einem Zellzählgeräts (Luna fl) gezählt und die benötigte Zellzahl in ein neues 50 ml Röhrengefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur wurde das alte Zellkulturmedium abgesaugt und unter Zugabe von Wachstums- bzw. Stimulationsmedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten (abwechselnd) eine Zellkonzentration von 0,5 Millionen Zellen pro Milliliter hergestellt. Diese Suspension wurde gut durchmischt und anschließend in Zellkulturflaschen überführt, die bei 37 °C im Brutschrank kultiviert wurden.

Die THP-1 KO NLRP3 Monozyten wurden analog zu den THP-1 Monozyten aufgetaut und eingefroren (Kapitel 2.2.2.1), wobei zum Auftauen das Wachstumsmedium (Tabelle 2.12) und zum Einfrieren das Einfriermedium für THP-1 KO NLRP3 Monozyten (Tabelle 2.14) verwendet wurde.

2.2.3.2 Differenzierung von THP-1 KO NLRP3 Monozyten zu Makrophagen

Die Differenzierung von THP-1 KO NLRP3 Makrophagen erfolgte analog zu den THP-1 Makrophagen (Kapitel 2.2.2.2), wobei für die Differenzierung das Differenzierungsmedium für THP-1 KO NLRP3

Makrophagen (Tabelle 2.16) und für die Ruhephase und anschließenden Stimulationsversuche das Stimulationsmedium für THP-1 KO NLRP3 Zellen (Tabelle 2.15) verwendet.

2.2.4 U937 Monozyten und Makrophagen

U937 ist eine promonozytäre, humane myeloische Leukämiezelllinie, die aus dem histiozytären Lymphom eines 37-jährigen Mannes isoliert wurde (211). Diese Zelllinie weist viele Merkmale von Monozyten auf und kann *in vitro* in makrophagenähnliche Zellen differenziert werden (212). Die Differenzierung von U937 Monozyten in Makrophagen kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Eine häufig verwendete Methode ist die Behandlung der U937 Zellen mit PMA (213,214). Bei U937 Zellen handelt es sich um Suspensionszellen, die nach Differenzierung zu U937 Makrophagen adhärent werden. Die U937 Zelllinie wurde von uns mit der Passage 19 von der Firma CLS erworben und wurde von Passage 21 bis 38 verwendet.

2.2.4.1 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der U937 Monozyten

Die U937 Zellen wurden analog zu den THP-1 Monozyten kultiviert, eingefroren und aufgetaut (Kapitel 2.2.2.1).

2.2.4.2 Differenzierung von U937 Monozyten zu U937 Makrophagen

Zur Differenzierung der U937 Monozyten in U937 Makrophagen wurde eine Zellkonzentration von 0,2 Millionen Zellen pro Milliliter in frisch hergestelltem PMA-haltigen Differenzierungsmedium hergestellt (Tabelle 2.10). Die Zellsuspension wurde analog zu den THP-1 Makrophagen ausgesät (jeweilige Volumina siehe Tabelle 2.68). Die Zellen wurden für 72 Stunden in dem PMA-haltigen Differenzierungsmedium im Brutschrank bei 37 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen mit warmen PBS gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von PMA-freiem komplementiertem RPMI 1640, das für 24 Stunden inkubiert wurde. Nach Ablauf von 24 Stunden Inkubationszeit konnten die ausdifferenzierten U937 Makrophagen für weitere Experimente verwendet werden.

2.2.5 Periphere, mononukleäre Blutzellen aus Humanblut

Zur Gewinnung von PBMCs aus Humanblut wurden Buffycoats aus der Hämatologie des Universitätsklinikums Bonn verwendet. Das den anonymen Spender*innen entnommene, venöse Blut wurde durch Zentrifugation aufgetrennt, sodass das Buffycoat-Blut gewonnen werden konnte. Buffycoat-Blut ist plasma- und erythrozytenarm. Die im Buffycoat-Blut enthaltenen PBMCs setzen sich hauptsächlich aus Monozyten, und Lymphozyten zusammen. Zusätzlich sind in Buffycoat-Blut geringe Restanteile an Thrombozyten, Granulozyten und Erythrozyten enthalten.

2.2.5.1 Isolation von peripheren, mononukleären Blutzellen aus Buffycoat-Blut

Zur Isolierung der PBMCs wurde die Dichtezentrifugation verwendet. Dazu wurden 15 ml Dichtezentrifugationsmedium in ein 50 ml Röhrengefäß vorgelegt und anschließend vorsichtig 35 ml des 1:3 mit PBS-EDTA (Tabelle 2.17) verdünnten Buffycoat-Bluts hinzugegeben, sodass sich beide Phasen nicht mischten. Anschließend wurde das geschichtete Buffycoat-Blut bei 400 g für 45 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurde das Buffycoat-Blut in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt und es zeigte sich eine Schichtung wie in Abbildung 2.1 dargestellt. Die Plasmaschicht auf den PBMCs wurde zunächst größtenteils abgenommen. Dann wurden die PBMCs mithilfe einer 1000 µl Eppendorf-Pipette in ein neues 50 ml Falcon überführt und mit PBS-EDTA auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 300 g bei Raumtemperatur (mit Bremse) wurden die sedimentierten PBMCs mit 50 ml kaltem PBS-EDTA resuspendiert. Anschließend folgten drei weitere Waschschrte mit 50 ml kaltem PBS-EDTA, wobei jeweils 15 Minuten mit 200 g bei 4 °C (mit Bremse) zentrifugiert wurde. Vor der Zentrifugation des dritten Waschgangs wurden 18 µl Zellsuspension für die Zellzahlbestimmung entnommen und mit 2 µl des Fluoreszenzfarbstoffs Acridine Orange gemischt, mit dessen Hilfe die genaue Anzahl der lebenden PBMCs im Zellzählgeräts (Luna fl) bestimmt werden konnte. Das Zellpellet wurde anschließend in komplementiertem RPMI (Tabelle 2.8) resuspendiert, sodass eine Zellzahl von 40 Millionen Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Je 125 µl der Zellsuspension wurden pro Vertiefung einer 24-Well Platte mit einer Eppendorf-Pipette pipettiert, sodass pro Well 5 Millionen PBMCs enthalten waren. Anschließend wurden die Versuche gestartet, indem 125 µl komplementiertes Medium oder Stimulationsreagenz zugefügt wurde.

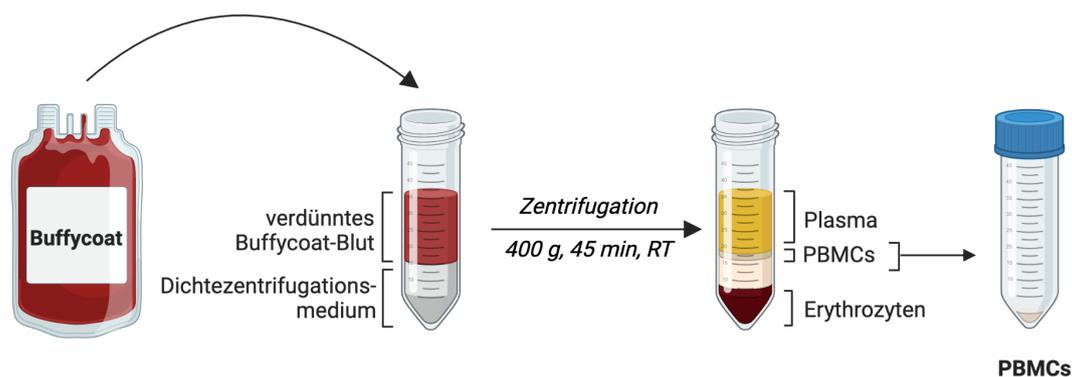


Abbildung 2.1: Isolation von PBMCs aus Buffycoat. Das Buffycoat-Blut wird verdünnt und auf Dichtezentrifugationsmedium geschichtet. Die anschließende Zentrifugation trennt das Blut in die verschiedenen Schichten auf. Dadurch kann die PBMC Zellschicht anschließend abgenommen werden. Nach einer Reihe von Waschschrten können die PBMCs in komplementiertem RPMI 1640 Medium aufgenommen und ausgesät werden.

2.2.6 HEK293 Zellen

Die HEK293 Zelllinie wurde durch Transformation einer humanen embryonalen Nierenzelle mit dem humanen Adenovirus Typ 5 Ende der 1970er Jahre hergestellt (215). HEK293 Zellen zeichnen sich durch ein adhärentes Wachstum aus. Da sie sich effizient transfizieren lassen, wurde die HEK293 Zelllinie für die Transfektion mit dem humanen P2X7-Rezeptor gewählt, um die rezeptorspezifische Signalkaskade zu untersuchen.

2.2.6.1 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen der HEK293 Zellen

Die HEK293 Zellen wurden in Wachstums- und Stimulationsmedium für HEK293 Zellen (Tabelle 2.18) kultiviert. Dabei handelt es sich um ein Medium auf Basis von DMEM mit hohem Glukoseanteil. Alle 3 bis 4 Tage, wenn eine 70-80%ige Konfluenz der Einzelschicht vorlag, wurden die Zellen passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium in der Zellkulturflasche vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 10 ml warmem PBS gewaschen. Danach wurden 3 ml TrypLE Express hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37 °C wurden die Zellen durch Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Durch Hinzufügen von 12 ml Wachstums- und Stimulationsmedium wurde die Reaktion abgestoppt. Nach Durchmischung mit einer serologischen Pipette wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrengefäß überführt. 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypan Blau Lösung gemischt und die Zellzahl wurde anschließend mithilfe eines Zellzählgeräts (Luna fl) bestimmt. Die restlichen Zellen wurden für 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Wachstums- und Stimulationsmedium resuspendiert. Pro Passagierintervall wurden 2 bis 3 Millionen Zellen in 16 ml Wachstums- und Stimulationsmedium in einer 75 cm² Kulturflasche kultiviert.

Zum Einfrieren wurden 3 bis 5 Millionen Zellen in 1 ml kaltem Einfriermedium für HEK293 Zellen (Tabelle 2.19) suspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Bevor die Zellen in den Stickstofftank überführt wurden, erfolgte das Einfrieren für 24 Stunden in der Einfrierbox bei -80 °C, analog zu den THP-1 Zellen (Kapitel 2.2.2.1). Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen kurz ins Wasserbad bei 37 °C gegeben. Danach wurde die Zellsuspension in ein mit 10 ml Wachstums- und Stimulationsmedium (Tabelle 2.18) befülltes 15 ml Röhrengefäß überführt. Die Zellsuspension wurde wie oben beschrieben zentrifugiert, danach wurde das alte Medium abgesagt. Das Zellpellet wurde in 12 ml frischem Wachstums- und Stimulationsmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine T75 cm² Zellkulturflasche überführt und die Zellkulturflasche wurde geschwenkt, sodass sich die Zellen gut verteilten. Die Zellen wurden Tage im Brutschrank bei 37 °C gelagert, bis eine 70-80%ige Konfluenz erreicht war.

2.2.6.2 Transfektion der HEK293 Zellen mit hP2X7-Rezeptor

Die Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen ist eine häufige Methode zur Untersuchung biologischer Mechanismen. Mithilfe von Polyethylenimin (PEI), einem stabilen kationischen Polymer, kann DNA in eine Wirtszelle transfiziert werden (216). PEI kondensiert DNA zu positiv geladenen Partikeln, die sich an anionische Zelloberflächen binden. Folglich wird der DNA-PEI-Komplex von den Zellen endozytiert und die DNA in das Zytoplasma freigesetzt (217).

In dieser Arbeit wurden HEK293 Zellen mit hP2X7-Rezeptor transfiziert. Dafür wurde das Plasmid pUNO1-hP2RX7 verwendet. Als Kontrollplasmid wurde pUNO1-mcs verwendet. Anstelle des Gens für den P2X7-Rezeptor hat das Kontrollplasmid eine Multiple-Klonierungsstelle (*Multiple cloning site*, mcs). Zellen, die mit dem Kontrollplasmid transfiziert wurden, dienten später als Kontrolle, um die Einflüsse der Transfektion ausschließen zu können. Einen Tag vor der Transfektion wurden 0,625 Millionen Zellen in 2,625 ml Transfektionsmedium für HEK293 Zellen (Tabelle 2.21) in einer mit Polylysin-Lösung beschichteten 6-Well-Platte (Kapitel 2.2.1) ausgesät. Die Platte wurde dann für ungefähr 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen eine Konfluenz von 60-80 % aufwiesen. Im Anschluss wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und pro Well 2,7 ml Transfektionsmedium mit einer Eppendorf-Pipette hinzugefügt. Die Platte wurde für 4 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde der Plasmid-PEI-Komplex hergestellt. Das Endverhältnis von Plasmid/PEI betrug 1:4 und pro Well wurden 0,3 ml Plasmid-PEI-Komplex benötigt. Dafür wurden zunächst die Plasmid- und PEI-Lösungen einzeln in je 150 µl OptiMEM-Medium hergestellt, die anschließend je 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die erforderlichen Mengen DNA und PEI-Lösung (Tabelle 2.20) können der Tabelle 2.69 entnommen werden. Danach wurde die PEI-Verdünnung langsam zur DNA-Lösung getropft. Damit sich der Plasmid-PEI-Komplex bildet, wurde die Mischung weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 2.69: Verwendete Mengen zur Herstellung des Plasmid-PEI-Komplexes

Plattenart	Verdünnungsreagenz (OptiMEM) pro Well gesamt	DNA	PEI
6-Well	0,3 ml	3 µg	12 µl

Nach Ablauf der 4-stündigen Inkubationszeit wurden pro Well 0,3 ml Plasmid-PEI-Komplex vorsichtig zu den 2,7 ml Transfektionsmedium hinzugefügt. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das alte Medium durch frisches Transfektionsmedium ersetzt und die Platte für weitere 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde jedes Well mit 3 ml warmen PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen erfolgte die Zugabe von 500 µl TrypLE Express. Nach 3 Minuten Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 ml Wachstums- und Stimulationsmedium für HEK293 Zellen (Tabelle

2.18) gestoppt. Die Zellen wurden in ein Röhrengefäß überführt und mit Hilfe des Zellzählgeräts (Luna fl) gezählt. Die benötigte Zellmenge wurde in ein neues Röhrengefäß überführt und 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde frisches Wachstums- und Stimulationsmedium für HEK293 zugegeben, sodass die gewünschte Zellkonzentration für den jeweiligen Versuch erreicht wurde. Anschließend konnten die Zellen ausgesät und das Experiment gestartet werden.

2.2.7 HEK Blue IL-1 β Zellen

HEK Blue IL-1 β Zellen wurden aus der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 entwickelt, um bioaktives IL-1 β nachzuweisen. HEK Blue IL-1 β -Zellen exprimieren den IL-1 Rezeptor und einen NF- κ B/AP-1-induzierbaren Reporter für sekretierte embryonale alkalische Phosphatase (SEAP). Die Stimulation des IL-1 Rezeptors durch beispielsweise bioaktives IL-1 β , löst eine Signalkaskade aus, die zur Aktivierung von NF- κ B/AP-1 und zur anschließenden Produktion von SEAP führt. SEAP wird ins Zellkulturmedium abgegeben und kann ein Substrat (z. B. QUANTI-Blue) umsetzen. Dadurch wird ein Farbumschlag von violett nach blau erreicht. Durch Ablesen der optischen Dichte (OD) bei 620 nm kann die SEAP-Konzentration bestimmt werden (Kapitel 2.4.1). Diese Zellen eignen sich deshalb zur Überwachung der IL-1 β -Freisetzung in Studien zur NLRP3-Inflammasom-Aktivierung. In dieser Arbeit wurden HEK Blue IL-1 β Zellen verwendet, um Überstände zuvor aktivierter THP-1 Zellen und PBMCs auf die Freisetzung von bioaktivem IL-1 β zu untersuchen.

2.2.7.1 Kultivierung, Einfrieren und Auftauen von HEK Blue IL-1 β Zellen

Die HEK293 Zellen wurden in Selektionsmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen (Tabelle 2.23) kultiviert. Alle 3 bis 4 Tage, wenn eine 70-80%ige Konfluenz der Einzelschicht vorlag, wurden die Zellen passagiert. Beim Passagieren wurde die Zellen analog zu den HEK293 Zellen behandelt, wobei zum Ablösen der Zellen kein TrypLE Express verwendet wurde. Stattdessen wurden die Zellen nach der Zugabe von 10 ml PBS durch Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrengefäß überführt. Nachdem die Zellen mit Trypan Blau Lösung mithilfe eines Zellzählgeräts (Luna fl) gezählt wurden, wurden sie für 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in Selektionsmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen resuspendiert. Pro Passagierintervall wurden 2 bis 3 Millionen Zellen in 16 ml Selektionsmedium in einer 75 cm² Kulturflasche kultiviert.

Das Einfrieren erfolgte analog zu den HEK293 Zellen (Kapitel 2.2.6.1), allerdings wurde zum Einfrieren das Einfriermedium für HEK Blue IL-1 β Zellen (Tabelle 2.24) und zum Auftauen das Basalmedium für HEK Blue IL-1 β Zellen (Tabelle 2.22) verwendet.

2.2.7.2 Einsäen der HEK Blue IL-1 β für Testung der Überstände zuvor aktivierter Zellen auf bioaktives IL-1 β

Um die HEK Blue IL-1 β Zellen auszusäen, wurden die Zellen wie beim Passagieren behandelt. Nachdem die Zellen gezählt wurden, wurde die benötigte Zellmenge in ein 50 ml Röhrengefäß überführt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, das alte Medium abgesaugt und Basalmedium (Tabelle 2.22) hinzugegeben, sodass eine Zellkonzentration von 0,3 Millionen Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Um den Überstand der aktivierten Zellen (= Proben) auf bioaktives IL-1 β zu untersuchen, wurden 50 μ l des Überstands der Proben pro Well in eine 96-Well Platte gegeben. Die Zugabe erfolgte in Duplikaten. In separate Wells wurde zusätzlich 50 μ l humanes IL-1 β in einer Konzentration von 0,25 μ l/ml pipettiert, was später als Positivkontrolle diente. Anschließend wurden in jedes verwendete Well 150 μ l der zuvor hergestellten HEK Blue IL-1 β Zellsuspension von 0,3 Millionen Zellen pro Milliliter mit einer Multikanalpipette zugefügt. Die Platte wurde für 20 Stunden bei 37 °C im Inkubator inkubiert, damit eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht wurde. Anschließend konnten die Zellen für den SEAP-Reporter-Test verwendet werden (Kapitel 2.4.1 und Abbildung 2.2).

2.2.8 Mykoplasmentest

Mykoplasmen sind kleine, zellwandlose Bakterien, die intra- und extrazellulär leben können. Sie sind eine der häufigsten Kontaminationen der Zellkultur. Sie behindern das zelluläre Wachstum und können Ergebnisse verfälschen. Da sie gegen die meisten Standardantibiotika resistent und lichtmikroskopisch nicht sichtbar sind, bleiben sie häufig unentdeckt. Um zu überprüfen, ob Zellkulturflaschen bzw. Zelllinien mit Mykoplasmen kontaminiert sind, muss also die bakterielle DNA mittels PCR nachgewiesen werden.

Für die Untersuchung der Zellen auf Mykoplasmen, wurden in regelmäßigen Abständen 1 ml Probe aus der Zellkulturflasche der jeweiligen Zelllinie entnommen, wenn diese eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatten. Die Probe wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR rein) überführt und für 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Für den Nachweis von Mykoplasmen in THP-1-Zellen musste vorerst eine DNA-Extraktion aus den Zellen erfolgen. Dies erfolgte mithilfe des InnuPREP DNA Kit der Firma Jena Bioscience. Dazu wurde der Überstand des 1,5 ml Reaktionsgefäßes abgesaugt. Das Zellpellet wurde zuerst mit 400 μ l TLS und 25 μ l Proteinase K bei 50 °C lysiert und anschließend mit 400 μ l TBS Bindungslösung auf die Spin-Säulen übertragen. Durch mehrmaliges Zentrifugieren (13000 g, 1 Minute, 20 °C) wurde die Säule zuerst mit 500 μ l HS Lösung und anschließend mit 750 μ l MS Lösung gewaschen, sodass die DNA in der Säule verbleibt und andere Zellbestandteile entfernt werden. Zum Schluss wurde die DNA mit 200 μ l *Elution Buffer* eluiert. Es wurden Filterspitzen verwendet, um DNasen von der Probe fernzuhalten.

Bei den anderen Zelllinien konnten eventuell vorhandene Mykoplasmen im Überstand, das heißt ohne vorherige DNA-Extraktion, nachgewiesen werden. Nach der Zentrifugation wurden 500 µl des Überstandes entnommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR rein) überführt und auf 95 °C erhitzt, um verbleibende Zellen zu zerstören. Anschließend wurden die Proben für 15 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet verworfen.

Jeweils 2 µl der extrahierten THP-1-DNA oder der Überstände wurden für den Mykoplasmen-Test verwendet. Für die weiteren Arbeitsschritte wurden Filterspitzen verwendet sowie weitere Verbrauchsmaterialien, die die benötigte Reinheit für die PCR-Analytik aufwiesen. Die Proben wurden auf Eis gelagert.

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird ein bestimmtes DNA-Fragment, sofern vorhanden, amplifiziert. Um das Fragment festzulegen, werden spezifische Primer verwendet. Hier wurden Primer eingesetzt, die Mykoplasmen-DNA-Abschnitte binden, sodass nur diese von der Polymerase vervielfältigt werden können. Eine Amplifikation von DNA in der Probe wäre ein Hinweis darauf, dass sich Mykoplasmen in der Zellkultur befinden. Für den Mykoplasmen-Test wurde mit Hilfe des Venor®GeM Classic Kit der Firma MB Minerva Biolabs ein Master-Mix hergestellt, der Reaktionspuffer, Primer/Nukleotid Mix, eine interne Kontrolle und die Taq Polymerase enthielt (Tabelle 2.27). Für jeden Test wurden neben den Proben auch eine Positivkontrolle (enthält Mykoplasmen-DNA) und eine Negativkontrolle (Wasser statt der Probe) inkludiert. Für die im Master-Mix enthaltene interne Kontrolle waren ebenfalls Primer enthalten, die im Falle einer fehlerfreien PCR dieses DNA-Fragment amplifizierten. Die interne Kontrolle wurde implementiert, um mögliche falsch negative Ergebnisse zu verhindern, beispielsweise wenn die PCR nicht ordnungsgemäß funktioniert hat, Inhibitoren die Ergebnisse beeinflusst haben oder bereits bei der DNA-Extraktion Fehler aufgetreten sind. Die Taq-Polymerase ist hitzestabil und hängt die passenden dNTP an die Primer an, wenn diese an ihr Template gebunden haben. Sie knüpft eine Phosphatesterbindung und synthetisiert in jedem Zyklus einen komplementären Strang zum Template.

Zu je 21,2 µl des Mastermixes, der in 0,2 ml Reaktionsgefäß aliquotiert wurde, wurden 2 µl der Proben bzw. der positiven Kontrolle oder Wasser gegeben. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und in ein PCR-Gerät (qPCR System qTOWER³G touch) überführt. Im Thermocycler liefen die Temperaturzyklen nach folgendem Schema ab (Tabelle 2.70): Denaturierung der doppelsträngigen DNA-Fragmente bei 95 °C. Die Primer lagern sich an die passenden Sequenzen der Einzelstränge bei 55 °C an. Bei 72° synthetisiert die Taq-Polymerase den komplementären Strang. Die entstandenen Doppelstränge lösen sich wieder voneinander bei 95 °C und so weiter. So werden die gesuchten Fragmente in 39 Zyklen stark amplifiziert.

Tabelle 2.70: PCR Amplifikation für den Mykoplasmen-Test

Zyklen	Temperatur und Zeit
1 Zyklus	95 °C, 2 min
39 Zyklen	94 °C, 30 sec 55 °C, 30 sec 71 °C, 30 sec
Halten	4 bis 10 °C

Um die PCR-Produkte auszuwerten, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurden zuerst 250 ml TBE-Puffer (1x) hergestellt, indem der 5x TBE-Puffer (5x konzentriert) (Tabelle 2.26) 1:5 mit doppelt demineralisiertem Wasser verdünnt wurde. Anschließend wurde ein 1,5%iges Agarosegel mit SYBR Safe hergestellt (Tabelle 2.28), indem die hergestellte Lösung in das Gelelektrophoresesystem Mini-Sub Cell GT horizontal gegossen wurde. Das Gel wurde in die Gelelektrophoresekammer gelegt und die Kammer mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt und anschließend der Kamm aus dem Gel gezogen. 10 µl Proben wurden mit 2 µl Cyan/Orange Ladepuffer auf einem Parafilmstreifen vermischt und 10 µl davon in die Taschen des Agarosegels geladen. Für die DNA-Leiter wurden 2 µl Cyan/Orange Ladepuffer mit 2 µl der 50 Basenpaar DNA-Leiter und 8 µl PCR Wasser vermischt und ebenfalls 10 µl in die Tasche des Gels pipettiert. Das Cyan/Orange machte es einfacher die Proben auf das Gel zu laden und zu verfolgen, da ein Farbstoff hinter und einer als Laufmittelfront vor den DNA-Fragmenten läuft. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 170 V für ca. 60 Minuten durchgeführt. Die DNA-Fragmente laufen aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden je nach Länge unterschiedlich stark im Gel zurückgehalten. Die Gelelektrophorese wurde beendet, wenn die Cyan/Orange Bande eine Laufhöhe von 7 cm erreicht hatte. Das Gel wurde entnommen und in ein Geldokumentationsgerät (BioRad Imager, ChemiDoc MP) überführt. Durch das im Agarosegel enthaltene SYBR Safe, ein Cyaninfarbstoff, der DNA bindet, blaues Licht absorbiert und grünes Licht emittiert, konnte die amplifizierte DNA als Banden im BioRad Imager sichtbar gemacht werden. Durch den Vergleich mit der DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Länge enthält, konnte auch die Fragmentgröße der Proben bestimmt werden. Bei der Negativkontrolle sollte eine Bande bei 191 Basenpaaren und bei der Positivkontrolle eine zusätzliche Bande bei 265 bis 278 Basenpaaren zu sehen sein. Wurde in der Probe nur eine Bande bei 190 Basenpaaren festgestellt, konnte eine Mykoplasmenkontamination ausgeschlossen werden.

2.3 Zellstimulation und Einsatz von Inhibitoren

2.3.1 Zellstimulation und Einsatz von Inhibitoren

Um die zellulären Signalwege zu untersuchen, die durch bestimmte Substanzen ausgelöst wurden, wurden Zellen zunächst auf unterschiedliche Weise unter aseptischen Bedingungen stimuliert. Darüber hinaus diente die Verwendung spezifischer Inhibitoren während der Stimulation der genaueren Charakterisierung der durch die stimulierenden Substanzen ausgelösten Effekte.

Je nach Fragestellung wurden verschiedene Zellarten verwendet. Wenn nicht anders beschrieben, wurden folgende Zellzahlen verwendet (Tabelle 2.71).

Tabelle 2.71: Zellartsspezifische Zellzahlen für Stimulationsversuche

Zellart	Zellzahl
U937 Makrophagen	0,2 Mio. Zellen
THP-1 Monozyten	3 Mio. Zellen
THP-1 Makrophagen	0,4 Mio. Zellen
THP-1 KO NLRP3 Makrophagen	0,4 Mio. Zellen
PBMCs	0,5 Mio. Zellen

Die folgende Tabelle (Tabelle 2.72) listet die Testsubstanzen in der verwendeten Arbeitskonzentration auf, die sich an Herstellerempfehlungen und verfügbaren Studien orientierten. Alle Stimulanzen wurde stets in für die jeweilige Zellart beschriebenen Stimulationsmedien verdünnt und unmittelbar vor Beginn des Experiments hergestellt. Eine Übersicht der verwendeten Stocklösungen findet sich in Tabelle 2.29.

Tabelle 2.72: Arbeitskonzentration der eingesetzten Stimulanzen

Stimulanzen	Arbeitskonzentration
5-BDBD	25 μ M
A804598	1 μ M
Ac-YVAD-cmk	40 μ M
AEBSF	300 μ M
Ap4	Sofern nicht anders angegeben 5 mM
ATP	Sofern nicht anders angegeben 5 mM
Atorvastatin	20 μ M
Bay 11-7082	20 μ M
BzATP	30 μ M
E64	10 μ M
Fluvastatin	20 μ M

Kaliumchlorid	75 mM
LPS	1 µg/ml
LS-91	1; 10 µM
MCC950	10; 40 µM
Nigericin	10 µM
oxATP	300 µM
Pam ₂ CSK ₄	1 µg/ml
Pam ₃ CSK ₄	1 µg/ml
Pepstatin A	50 µM
PPADS	100 µM
SAHA	10 µM
SLW118	1; 10 µM
SLW120	10 µM
Thalidomid	10 µM
Tubastatin A	1; 10 µM
z-VAD-fmk	40 µM

Für Untersuchungen des NLRP3-Inflammasoms wurden Zellen für 3 Stunden in 250 µl Stimulationsmedium mit Pam₃CSK₄, Pam₂CSK₄, LPS oder Wachstumsmedium vorinkubiert bzw. *geprimt*. Anschließend wurden THP-1 Makrophagen, THP-1 KO NLRP3 Makrophagen und PBMCs für weitere 3 Stunden und THP-1 Monozyten für 6 Stunden mit Ap₄, ATP, Nigericin oder BzATP stimuliert. In ausgewählten Experimenten wurde 1 Stunde vor Stimulation der nicht-kompetitive P2X7-Rezeptorantagonist A804598, der irreversible P2X7-Rezeptorantagonist oxATP, P2X₄-Rezeptorantagonist 5-BDBD, P2-Rezeptorantagonist PPADS, NLRP3-Inhibitor MCC950 (CRID3) oder Bay 11-7082, Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD-cmk, Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk, Serinprotease-Inhibitor AEBSE, Cysteinprotease-Inhibitor E64, oder der Aspartatprotease-Inhibitor Pepstatin A hinzugefügt. Um die Abhängigkeit des K⁺-Effluxes zu untersuchen, wurde die Stimulation Pam₃CSK₄-*geprimter* THP-1-Makrophagen in Gegenwart von Kaliumchlorid durchgeführt.

Um den Einfluss von HDAC6 an der NLRP3-vermittelten Entzündung zu untersuchen, wurde HDAC6 mittels PROTAC Strategie abgebaut. Dazu wurden die THP-1 Makrophagen 24 Stunden mit dem PROTAC LS-91 oder der Kontrollsubstanz SLW-118 vorinkubiert, bevor anschließend das *Priming* und die Stimulation erfolgten. Der HDAC6-Inhibitor Tubastatin A, der pan-HDAC-Inhibitor SAHA, Thalidomid oder SLW120 wurden in ausgewählten Experimenten nach Abschluss des *Primings*, 1 h vor der Stimulation, hinzugefügt.

Nach der Stimulation wurde der Zellkulturüberstand entnommen und für die spätere Analysen mittels ELISA in Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und bei -20 °C oder -80 °C gelagert. Die Zellen wurden dagegen für die sich jeweils anschließende Analytik unterschiedlich aufbereitet.

2.4 Methoden zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung

2.4.1 SEAP-Reporter-Test

Der SEAP-Reporter-Assay ermöglicht die Messung der transkriptionellen Aktivität in Abhängigkeit von bestimmten Stimuli. Dabei dient das SEAP-Gen als Reportergen für die Untersuchung der Promoteraktivität in transfizierten eukaryotischen Zellen. Es wird in die Zelle transfiziert und ist an eine bestimmte Promoterregion des Genoms gebunden. Werden die entsprechenden Transkriptionsfaktoren aktiviert, führt dies zu einer Produktion von SEAP, das anschließend von den Zellen sezerniert wird. Die SEAP-Produktion der Zellen wird dann durch Zugabe eines speziellen Substrats gemessen, das von SEAP zu einem kolorimetrisch messbaren Signal umgewandelt wird. Die Höhe des Signals ist ein Maß für die SEAP-Aktivität in den Zellen und somit auch für die Aktivierung des untersuchten Signalwegs. In dieser Arbeit wurden HEK Blue IL-1 β Reporterzellen verwendet, die den IL-1 Rezeptors exprimieren und mit dem SEAP-Reporter-Gen transfiziert waren. Eine Stimulation des IL-1 Rezeptors führte zur Freisetzung von SEAP in das Zellkulturmedium, das die QUANTI-blue Substratlösung kolorimetrisch umsetzte und damit Rückschlüsse auf die Menge des IL-1 β im Zellkulturüberstand der aktivierten, zu untersuchenden Proben lieferte (Kapitel 2.2.7). Eine schematische Darstellung des SEAP-Reporter-Tests ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

Nachdem die HEK Blue IL-1 β Zellen für 20 Stunden mit dem zu untersuchenden Überständen der aktivierten Zellen inkubiert wurden (Kapitel 2.2.7.2), wurde die 96-Well Platte für 5 Minuten mit 200 μ l bei 37 °C zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden in eine neue 96-Well Platte 180 μ l QUANTI-blue Substratlösung (Tabelle 2.31) pro Vertiefung mit Hilfe einer Multikanalpipette pipettiert. Nach der Zentrifugation wurden mit der Multikanalpipette 20 μ l des Überstandes der HEK293 Reporterzellen zu der QUANTI-blue Substratlösung zugefügt. Als Blindwert diente die reine QUANTI-blue Lösung. Die Platte wurde bei 37 °C im Brutschrank für 30 bis 45 Minuten inkubiert, wobei alle 5 Minuten mit dem Mikroplatten-Leser (Mithras2 LB 943: 620/10 BP) die Absorption gemessen wurde, bis die Positivkontrolle (HEK Blue IL-1 β Zellen, die mit 0,25 μ g/ml humanen IL-1 β inkubiert wurden) einen Wert von 0,8 bis 1,2 erreicht hatte.

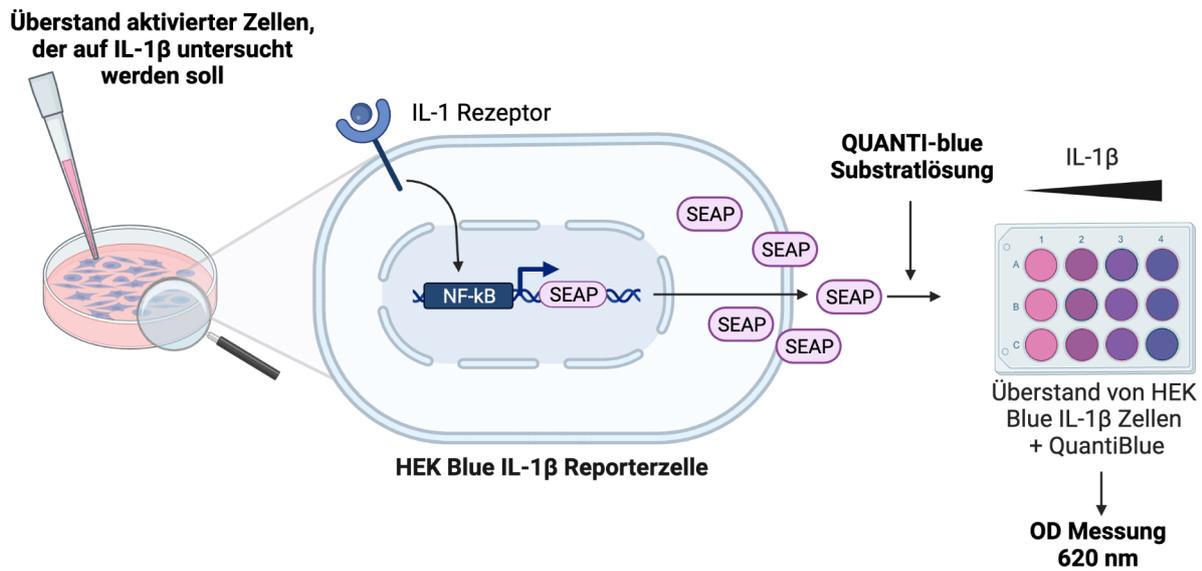


Abbildung 2.2: SEAP-Reporter-Test mit HEK Blue IL-1 β Reporterzellen. Überstand aktivierter Zellen wird mit HEK Blue IL-1 β Zellen für 24 Stunden inkubiert. Durch Stimulation des IL-1 Rezeptors wird NF- κ B-vermittelt die Produktion von SEAP angeregt, das in das Zellmedium sekretiert wird. Die SEAP-Produktion im Überstand der HEK Blue Zellen kann durch Zugabe von QUANTI-blue Lösung durch Messung der optischen Dichte bei 620 nm bestimmt werden. Abbildung modifiziert nach (218).

2.4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellen, die auf der Messung und Analyse des Lichts, das von den Zellen beim Durchgang durch einen Laserstrahl gestreut und emittiert wird, basiert. Sie ermöglicht es, Zellen schnell und automatisch nach bestimmten Merkmalen zu sortieren und zu zählen.

Nach der Vorbereitung der Probe wird sie durch einen Kanal im Durchflusszytometer geleitet, die mit einer Lichtquelle und einer Reihe von Detektoren ausgestattet ist. Jede einzelne Zelle, die durch die Kammer fließt, wird von einem Laserstrahl getroffen und reflektiert oder streut das Licht in unterschiedlichen Winkeln, abhängig von ihrer Größe, Form und optischen Eigenschaften. Ein optisches System sammelt das reflektierte oder gestreute Licht und erzeugt ein Signal, das von einem Detektor detektiert wird. Durch Messung des Vorwärtsstreulichts kann eine Aussage über die Zellgröße getroffen werden, während das Seitwärtsstreulicht eine Aussage zur Granularität der Zelle ermöglicht.

Werden die Zellen zuvor mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert, die gezielt an bestimmte Moleküle oder Zellbestandteile binden (z. B. fluoreszenzmarkierte Antikörper), regen die Laser die Fluoreszenzfarbstoffe an, die dann Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Die emittierte Fluoreszenz wird dann von Detektoren erfasst. Durch im Durchflusszytometer verbaute Filter, die Licht

einer bestimmten Wellenlänge durchlassen, können in verschiedenen Kanälen die Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. Dies ermöglicht es, verschiedene fluoreszierende Farbstoffe gleichzeitig zu analysieren. In der Tabelle 2.73 sind die Laser und Fluoreszenzkanäle aufgelistet, mit der das in unserem Labor vorhandene Durchflusszytometer CytoFlex ausgestattet war. Außerdem wird angegeben, welche Fluoreszenzfarbstoffe in welchem Kanal gemessen und analysiert wurden.

Tabelle 2.73: Cytoflex Durchflusszytometer

Wellenlänge	Fluoreszenzkanal	Name des Kanals	Gemessene Farbstoffe
488 nm	525/40 BP	FITC	FITC-gekoppelte Antikörper, YO-PRO-1
	585/42 BP	PE	PE-gekoppelte Antikörper
	610/20 BP	ECD	
	690/50 BP	PC5.5	
	780/60 BP	PC7	
638 nm	660/10 BP	APC	APC647-gekoppelte Antikörper, MACSPlex Detektionsreagenz
	712/25 BP	APC-A700	
	780/60 BP	APC-A750	APC-Fire750-gekoppelte Antikörper
405 nm	450/45 BP	PB450	BV471-gekoppelte Antikörper
	525/40 BP	KO525	Zombie Aqua
	610/20 BP	Violet610	
	660/10 BP	Violet660	
	780/60 BP	Violet780	

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für die Bestimmung der Oberflächenmarker-Expression, die YO-PRO-Färbung, den Multiplex Assay und den Annexin V-FITC/Zombie Aqua Zellviabilitätstest verwendet.

2.4.2.1 Probenvorbereitung

Der erste Schritt bei der Durchflusszytometrie war die Vorbereitung der Probe. Die Zellen wurden in eine Suspension gegeben und auf die gewünschte Konzentration gebracht. Dafür wurde die benötigte Zellmenge von U937 Monozyten oder THP-1 Monozyten in ein 50 ml Röhrengefäß überführt.

Damit adhärenzte Zellen wie U937 Makrophagen, THP-1 Makrophagen, HEK293 oder PBMCs in Suspension gebracht werden konnten, mussten die Zellen zuerst abgelöst werden. Dazu wurde das alte Medium vorsichtig von der Zellkulturflasche oder Zellkulturplatte abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro 75 cm² Zellkulturflasche 5 ml und pro Well einer 24-Well Platte je 250 µl TrypLE Express hinzugefügt und für 5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde kräftig am Boden der Zellkulturflasche oder Zellkulturplatte geklopft, damit sich die Zellen ablösen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 ml bzw. 750 µl komplementiertem RPMI 1640 (Tabelle 2.8) gestoppt und die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrengefäß überführt. Die Zellen wurden für 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und das alte Medium abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS resuspendiert und für die Zellzahlbestimmung (Luna fl) wurden 10 µl Zellsuspension entnommen. Die restlichen Zellen wurden erneut zentrifugiert.

Nach Zentrifugation von 5 Minuten mit 200 g wurde der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde PBS zugefügt, sodass eine Zellkonzentration von 1 Millionen Zellen pro Milliliter entstand und je 400 µl in ein FACS Röhrengefäß überführt, sodass in jedem Gefäß 0,4 Millionen Zellen enthalten waren. Nach erneuter Zentrifugation konnte der Überstand dekantiert werden und die Zellen waren für die folgenden Färbeschritte bereit. Die Lagerung der Zellen erfolgte ab diesem Schritt auf Eis.

2.4.2.2 Bestimmung der Oberflächenmarker-Expression

Um die U937 Makrophagen zu charakterisieren, wurde die Expression zellspezifischer Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür werden fluoreszenzgekoppelte-Antikörper verwendet, die gezielt an zellspezifische Oberflächenproteine binden. Nach Anregung durch Laser, emittieren die Fluoreszenzfarbstoffe Licht einer bestimmten Wellenlänge, das in verschiedenen Kanälen gemessen wurde. Die Messung der Fluoreszenzintensität bot Rückschlüsse auf die in der Probe enthaltenen Zellen, die positiv für den jeweiligen Farbstoff waren und demnach den jeweiligen Oberflächenmarker exprimierten.

Zur Messung der Oberflächenmarker-Expression wurden die U937 Monozyten und Makrophagen in Suspension gebracht und in FACS-Röhrengefäßen verteilt, sodass pro Röhrengefäß 0,4 Millionen Zellen enthalten waren (Kapitel 2.4.2.1). Neben der zu untersuchenden Probe mussten genug Kontrollen eingeschlossen werden, damit die Auswertung später korrekt erfolgen konnte.

Um die Autofluoreszenz der Zellen zu bestimmen, wurde eine ungefärbte Probe verwendet. Daneben gab es eine Kontrolle mit toten Zellen, die nur mit dem Lebend-/Tot-Marker Zombie Aqua gefärbt wurden. Da mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig vermessen werden, ist es möglich, dass sich die Emissionsspektren der Farbstoffe überlagern und eine Kompensation erfolgen muss. Dafür musste für jeden Farbstoff eine einzel-gefärbte Kontrolle vorliegen, die nur mit dem jeweiligen

fluoreszenzmarkierten Antikörper oder Zombie Aqua behandelt wurde. Um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen, wurden außerdem *fluoreszenz-minus-one* (FMO) Kontrollen verwendet, die alle fluoreszenzmarkierten Antikörper außer jeweils einen enthalten. FMO-Kontrollen wurden statt Isotyp-Kontrollen verwendet.

Um eine Kontrolle mit toten Zellen zu erhalten, wurde die Probe für 20 Minuten bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Die anderen Proben wurden in der Zwischenzeit auf Eis gelagert. Im Anschluss wurde zentrifugiert (5 Minuten, 200 g, 4 °C). Nachdem der Überstand dekantiert wurde, wurde PBS vorgelegt, sodass nach Zugabe der Antikörper ein Endvolumen von 200 µl erhalten wurde.

Mit Ausnahme der ungefärbten Kontrolle, wurden pro FACS-Röhrengefäß 5 µl Human Tru Stain Fc-Block hinzugegeben, damit unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc Rezeptoren verhindert werden konnte. Die Zellen wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden 2 µl einer 1:20 verdünnten Zombie Aqua Lösung (Endverdünnung 1:500) und 5 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörper (Tabelle 2.74) hinzugegeben und weitere 15 Minuten auf Eis unter Lichtausschluss inkubiert.

Tabelle 2.74: Verwendete fluoreszenzmarkierte Antikörper und Lebend-/Tot-Marker für die Bestimmung der Oberflächenmarker-Expression mittels Durchflusszytometrie

Antikörper oder Marker	Fluoreszenzkanal
Monoklonaler humaner CD14 Antikörper (Klon 63D3), APC/Fire750-konjugiert	APC-A750
Monoklonaler humaner CD11b Antikörper (Klon ICRF44), BV421-konjugiert	PB450
Monoklonaler humaner CD11c Antikörper (Klon 3.9), PE-konjugiert	PE
Monoklonaler humaner CD86 Antikörper (Klon IT2.2), AlexaFluor647-konjugiert	APC
Monoklonaler humaner CD11b Antikörper (Klon ICRF44), PE-konjugiert	PE
Zombie Aqua	KO252

Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 1 ml kaltem PBS abgestoppt und die Zellen bei 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden nun einmal mit 500 µl kaltem PBS und einmal mit 500 µl kaltem FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 200 µl kaltem FACS-Puffer resuspendiert vermessen. Die Auswertung erfolgte nach Kompensation im jeweiligen Fluoreszenzkanal (Tabelle 2.74).

2.4.2.3 YO-PRO-Färbung

Die YO-PRO-Färbung ist eine Methode, um die Aktivität von P2X7-Rezeptoren zu messen. YO-PRO-1 ist ein zellmembranundurchlässiger Fluoreszenzfarbstoff mit Bindungsaffinität an Nukleinsäuren. Die Aktivierung von P2X7-Rezeptoren führt zur Öffnung einer Membranpore (Kapitel 1.2.1) (87), die durchlässig für YO-PRO-1 ist. Dringt YO-PRO-1 in die Zelle ein, bindet es an DNA und fluoresziert

(Abbildung 2.3). Dieses Fluoreszenzsignal kann dann quantifiziert werden, um die Aktivität der P2X7-Rezeptoren zu messen (82).

Da die Anregungs- und Emissionswellenlängen von YO-PRO-1 bei 491 nm bzw. 509 nm liegen, konnte die Fluoreszenz im FITC-Kanal des Durchflusszytometers CytoFlex gemessen werden.

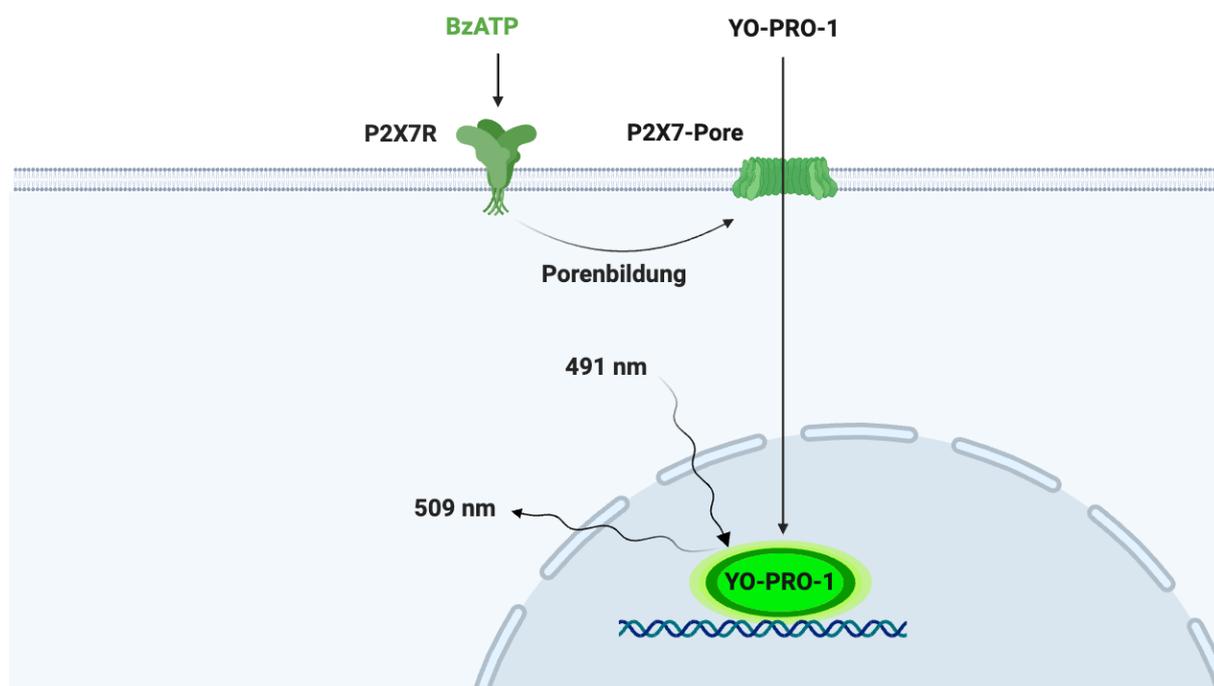


Abbildung 2.3: Prinzip der YO-PRO-1 Färbung zur Untersuchung der P2X7-Rezeptoraktivität. Aktivierung des P2X7-Rezeptors macht die Zellen permeabel für den Fluoreszenzfarbstoff YO-PRO-1. Abbildung modifiziert nach (82).

In der vorliegenden Arbeit wurde der YO-PRO-Assay in THP-1 Makrophagen und hP2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen durchgeführt, um die Aktivität von Ap4 am P2X7-Rezeptor zu untersuchen. Bei diesem Assay wurde ich von der Erasmus-Studentin Veronica Colamassaro unterstützt, die die Experimente eigenständig unter meiner Aufsicht durchführte.

THP-1 Makrophagen wurden nach der Stimulation mit dem P2X7-Rezeptorliganden BzATP für die durchflusszytometrische Untersuchung vorbereitet. Dazu wurden die Zellen mit TrypLE Express abgelöst und in ein Röhrengefäß überführt und zentrifugiert (Kapitel 2.4.2.1). HEK293 Zellen wurden mit dem pUNO1-hP2RX7 oder pUNO-mcs transfiziert und anschließend ebenfalls in ein Röhrengefäß überführt und zentrifugiert (Kapitel 2.2.6.2). Nach der Zentrifugation wurde YO-PRO-Puffer (Tabelle 2.33) hinzugegeben, sodass eine Zellkonzentration von 1 Millionen Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Je 400 µl der Zellsuspension wurden in ein FACS-Röhrengefäß überführt, sodass pro Gefäß 0,4 Millionen Zellen enthalten waren. Neben den Proben wurde eine ungefärbte und eine Positivkontrolle mit abgetöteten Zellen eingeschlossen. Tote Zellen haben keine intakte Zellmembran, sodass der

Farbstoff YO-PRO-1 die Zellmembran durchdringen kann, was mit einer gesteigerten Fluoreszenzintensität einhergeht. Die ungefärbte Kontrolle war unbehandelt und ungefärbt, während die Positivkontrolle nur mit dem YO-PRO-Farbstoff behandelt wurde. Um die Zellen abzutöten, wurde ein FACS-Röhrengefäß mit Zellen für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Danach wurde YO-PRO-Puffer vorgelegt, sodass ein Endvolumen von 200 µl erreicht wurde. Mit Ausnahme der ungefärbten Kontrolle wurden alle Proben mit 2 µl einer zuvor 1:5 verdünnten YO-PRO-1-Farbstofflösung (Stock: 1 mM) versetzt (Endkonzentration 2 µM). Außerdem wurde für die Untersuchung der transfizierten HEK293 Zellen nun die Stimulanzen BzATP und Ap4 zugefügt, sodass eine Endkonzentration von 300 µM bzw. 5 mM erreicht wurde. Nachdem die Zellen 60 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert wurden, wurde die Reaktion gestoppt, indem 1 ml kaltes PBS hinzugefügt wurde. Die Zellen wurden 5 Minuten mit 200 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden anschließend 2 Mal mit 1 ml YO-PRO-Puffer gewaschen und schlussendlich in 200 µl kaltem FACS-Puffer (Tabelle 2.32) resuspendiert und bis zum Vermessen mit dem Durchflusszytometer auf Eis gelagert. Die Auswertung erfolgte im FITC-Kanal, wobei die Auswertung YO-PRO-1-positiver Zellen im Vergleich zur unbehandelten, mit YO-PRO-1 gefärbten Probe erfolgte.

2.4.2.4 Multiplex Assay

Multiplex Assays sind für die Bestimmung der Konzentrationen von verschiedenen Zytokinen in einer einzigen Probe konzipiert. In dieser Arbeit wurde das MACSplex Cytokine 12 Kit verwendet, mit dem die Konzentration von GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-17A, und TNF bestimmt werden kann. Die Analyse basiert auf MACSplex Capture Beads, die über definierte Fluoreszenzeigenschaften verfügen und mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden können. Proben, die unbekannte Mengen an Zytokinen enthalten, werden mit einem Cocktail aus verschiedenen antikörperbeschichteten MACSplex Beads inkubiert. Die in den Proben enthaltenen Zytokine binden an die spezifischen Antikörper der fluoreszenzmarkierten Beads. Anschließend werden die Zytokine mit dem Detektionsreagenz, das verschiedene APC-konjugierte Anti-Zytokin-Antikörper enthält, markiert. Folglich bilden sich Sandwich-Komplexe zwischen dem MACSplex Capture Bead, dem Zytokin und dem Detektionsreagenz. Diese Komplexe können auf der Grundlage der Fluoreszenzeigenschaften sowohl des MACSplex Beads als auch des Detektionsreagenzes analysiert werden. Standardlösungen mit bekannten Konzentrationen bestimmter Zytokine dienen zur Quantifizierung der unbekanntes Zytokinkonzentrationen der Proben (219).

PBMCs wurden wie beschrieben aus Buffycoats isoliert (Kapitel 2.2.5.1) und stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 10 Minuten mit 10000 g bei

4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und konnte bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

Zunächst wurde der Standard mit 200 µl MACSPlex-Puffer rekonstituiert und es wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, indem der Standard 1:5 mit MACSPlex-Puffer verdünnt wurde. So wurde fortgefahren und eine serielle Verdünnung hergestellt bis eine Endverdünnung von 1:3125 erreicht war. Die Wells der im Kit enthaltenen 96-Well Filterplatte wurden angefeuchtet, indem 200 µl MACSPlex-Puffer pro Well mit einer Multikanalpipette hineingegeben wurden. Unbenutzte Wells wurden mit einer Klebefolie abgedeckt. Der MACSPlex-Puffer wurde entfernt, indem die Filterplatte auf eine neue 96-Well Platte gestellt wurde und anschließend für 3 Minuten mit 300 g bei 20 °C zentrifugiert wurde. Das Filtrat wurde verworfen. In die Filterplatte wurden 50 µl des Standards oder der Proben in Duplikaten hinzugefügt. Anschließend wurden je 20 µl pro Well von der zuvor gevortexten MACSPlex Capture Beads Lösung hinzu pipettiert. Während einer 2-stündigen Inkubationszeit unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur banden die Zytokine an die jeweiligen antikörperbeschichteten MACSPlex Capture Beads. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte auf eine unbenutzte 96-Well Platte gestellt und für 3 Minuten mit 300 g bei 20 °C zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Standard und die Proben insgesamt 2 Mal mit 200 µl MACSPlex-Puffer gewaschen. Nachdem der MACSPlex-Puffer durch Zentrifugieren auf einer unbenutzten 96-Well Platte entfernt wurde, wurden 80 µl MACSPlex-Puffer und 20 µl Zytokin-Detektionsreagenz hinzugefügt. Das Zytokin-Detektionsreagenz enthielt eine Mischung aus 12 verschiedenen APC-markierten Anti-Zytokin-Antikörpern, die gegen die zu detektierenden Zytokine gerichtet waren. Somit bildeten sich nun der Sandwich-Komplex aus. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurde die Filterplatte anschließend wie oben beschrieben auf eine neue 96-Well Platte gestellt und zentrifugiert, um den Überstand zu entfernen. Die Platte wurde einmal mit 200 µl MACSPlex-Puffer gewaschen und der Puffer durch Zentrifugieren entfernt. Anschließend wurde 200 µl MACSPlex-Puffer mit einer Multikanalpipette hinzugefügt und die Platte war bereit für die Messung im Durchflusszytometer (CytoFlex). Mithilfe der MACSPlex Setup Beads wurde die Spannung und das Hintergrundrauschen angepasst. Dazu wurden 1 Tropfen der MACSPlex Setup Beads in 1 ml MACSPlex-Puffer gelöst und 200 µl dieser Lösung in die 96 Well Platte pipettiert und einzeln vermessen. Die Einstellungen wurde für das restliche Plattendesign übertragen und die Messung wurde gestartet, indem zuerst die Standardreihe von der niedrigsten zur höchsten Konzentration gemessen wurde. Pro Well wurden 3600 Events detektiert.

Die 12 verschiedenen Bead Populationen ließen sich durch unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten im FITC- und PE- Kanal des CytoFlex unterscheiden. Mithilfe der Verdünnungsreihe wurde über Messung des Medians der APC-Fluoreszenzintensität für jedes der 12 Zytokine die jeweilige Standardgerade erstellt. Durch Messung der APC-Mediane der einzelnen Capture Bead Population konnten anhand der Standardgeraden die in den Proben enthaltenen Zytokinkonzentrationen bestimmt werden.

2.4.3 Zellviabilitätsuntersuchungen

Der Einsatz von Zellviabilitätsuntersuchungen ist wichtig, um die Toxizität verschiedener Stimuli auf die Zellen zu untersuchen. Damit sind sie von entscheidender Bedeutung, um Versuchsergebnisse genau zu interpretieren und zu gewährleisten, dass der Effekt der eingesetzten Stimuli auf deren Wirkungsmechanismus und nicht auf deren Toxizität zurückzuführen sind. Es gibt verschiedene Tests, die im Labor zum Einsatz kommen, die auf unterschiedlichen Methoden beruhen.

2.4.3.1 Annexin V-FITC/Zombie Aqua-Test

Annexin V-FITC/Zombie Aqua-Test ist ein Doppelfärbeverfahren, mit dem nekrotische und apoptotische Zellen mittels durchflusszytometrischer Messung erfasst werden können. Annexin V ist ein Protein, das Calcium-abhängig an Phosphatidylserin bindet, ein Phospholipid, das sich normalerweise auf der inneren Plasmamembran gesunder Zellen befindet. Wenn eine Zelle jedoch der Apoptose unterliegt, wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran verlagert, wodurch es für Annexin V zugänglich wird. Zombie Aqua hingegen ist ein Amin-bindender Fluoreszenzfarbstoff, der für lebende Zellen mit intakter Zellmembran nicht durchlässig ist, aber die beschädigte Zellmembran nekrotischer Zellen durchdringen kann und im Zellinneren an Amine bindet (220,221). Annexin V-FITC und Zombie Aqua können auf Grund ihrer unterschiedlichen Emissionsmaxima bei 517 und 405 nm nebeneinander detektiert werden. Durch die Kombination der Annexin V und Zombie Aqua Färbung ist es möglich, mit Messung im Durchflusszytometer lebende Zellen (Annexin V und Zombie Aqua-negativ), frühe apoptotische Zellen (Annexin V-positiv und Zombie Aqua-negativ), spät apoptotische Zellen (Annexin V und Zombie Aqua-positiv) und nekrotische Zellen (Annexin V-negativ und Zombie Aqua-positiv) voneinander zu unterscheiden.

Für die Durchführung des Annexin V-FITC/Zombie Aqua-Tests wurden die Zellen wie gewohnt in einer 24 Well Platte ausgesät und stimuliert. Dabei wurde darauf geachtet, dass insgesamt 6 Kontroll-Wells (Zellen in Zellkulturmedium) ausgesät wurden, da diese anschließend für die Durchführung der Durchflusszytometrie benötigt wurden. Nach Ablauf der Stimulationszeit, wurde der Zellkulturüberstand jeweils in ein FACS-Röhrengefäß überführt, welches auf Eis gelagert wurde. Die Wells der Zellkulturplatte wurden anschließend mit 500 µl kaltem PBS gewaschen, wobei das PBS wieder in dem jeweiligen FACS-Röhrengefäß gesammelt wurde. Wenn THP-1 Makrophagen auf Zellviabilität untersucht wurden, wurden diese mit je 250 µl TrypLE Express für 5 Minuten bei 37 °C im Inkubator inkubiert. Damit sich die THP-1 Makrophagen ablösen, wurde nach der Inkubationszeit kräftig am Boden der Zellkulturplatte geklopft. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 750 µl komplementiertem RPMI 1640 (Tabelle 2.8) gestoppt und die Lösung wurde in das jeweilige FACS-Röhrengefäß hinzugefügt. Die Zellkulturplatte wurde anschließend nochmal mit je 500 µl kaltem PBS gewaschen. Danach wurde das FACS-Röhrengefäß für 5 Minuten mit 200 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und

die Zellen in 1 ml kaltem PBS resuspendiert. Für die Positivkontrolle und die Kontrollen zur Kompensation wurde nun die Apoptose mittels Hitze induziert, indem 2 FACS-Röhrengefäße für 10 Minuten bei 70 °C im Wasserbad inkubiert wurde, der eine fünfminütige Inkubationszeit auf Eis folgte. In der Zwischenzeit wurden die anderen Proben auf Eis gelagert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurde der Inhalt eins der beiden Röhren mit einem anderen Kontrollröhren, das nicht mit Hitze behandelt wurde, gemischt und anschließend wieder 1:1 in ein FACS-Röhrengefäß aufgeteilt, sodass man 2 Röhren mit je 50 % toten und 50 % lebenden Zellen erhielt, die später für die Einfachfärbung für die Kompensation verwendet wurden. Das andere Röhren, die mit Hitze behandelt wurde, enthielt 100 % tote Zellen und diente später als Positivkontrolle. Anschließend wurden alle FACS-Röhrengefäße für 5 Minuten mit 200 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand danach dekantiert. Die Zellen wurden anschließend mit der erforderlichen Menge an FACS-Bindungspuffer resuspendiert (Tabelle 2.75). Die FMO-Kontrollen entsprechen dabei den unbehandelten Kontrollen, während die positiven Einfachfärbungen mit dem Zellgemisch aus 50 % lebenden und 50 % toten Zellen erfolgte.

Tabelle 2.75: Pipettierschema für Annexin/Zombie Aqua-Test

	ungefärbt	FMO ohne Annexin	FMO ohne Zombie Aqua	Pos. Zombie Aqua	Pos. Annexin	Positiv- kontrolle	Proben
Bindungspuffer	200 µl	196 µl	198 µl	196 µl	198 µl	194 µl	194 µl
Zombie Aqua	x	4 µl	x	4 µl	x	4 µl	4 µl
Annexin V-FITC	x	x	2.5 µl	x	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl

Es wurden 4 µl einer 1:20 Verdünnung von Zombie Aqua (Endverdünnung 1:1000) hinzugefügt (Tabelle 2.75), gevortext und für 10 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden 2,5 µl Annexin V-FITC Farbstoff hinzugegeben (Tabelle 2.75) und weitere 10 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml kaltem PBS gestoppt und die Zellen einmal mit 200 µl FACS-Bindungspuffer gewaschen, bevor die Zellen schlussendlich in 200 µl Bindungspuffer resuspendiert wurden. Bis die Proben mit dem Durchflusszytometer (CytoFlex) vermessen wurden, erfolgte die Lagerung auf Eis. Anhand der positiven Einzelfärbungen wurde eine Kompensation durchgeführt.

2.4.3.2 Trypan-Blau Färbung

Die Trypan-Blau-Färbung ist eine gängige Methode zur Messung der Lebensfähigkeit von Zellen in Zellkulturen. Sie beruht auf dem Prinzip, dass lebensfähige Zellen intakte Zellmembranen haben, die

bestimmte Farbstoffe ausschließen, während nicht lebensfähige Zellen beschädigte oder beeinträchtigte Membranen haben, die es den Farbstoffen ermöglichen, in die Zelle einzudringen und das Zytoplasma zu färben. Als Farbstoff wurde Trypan-Blau verwendet (222).

Die Trypan-Blau-Färbung wurde regelmäßig verwendet, um die Viabilität der Zellen vor dem Aussäen zu überprüfen. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypan-Blau-Lösung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Davon wurden 10 µl in die Zählkammer pipettiert und mit dem Zellzählgerät ausgezählt. Die toten Zellen erschienen blau gefärbt, die lebenden weiß, wobei das Zellzählgerät beide Zellfarben voneinander unterschied. Die Zellviabilität konnte bestimmt werden, indem der Anteil der lebenden Zellen auf die Gesamtsumme der Zellen bezogen wurde, was durch das Zellzählgerät automatisch ermittelt wurde.

2.4.3.3 MTT-Test

Das Prinzip des MTT-Tests zur Untersuchung der Zellviabilität beruht auf der Umwandlung des Farbstoffs MTT von seiner gelben Farbe in ein violettes, wasserunlösliches Formazanprodukt durch mitochondriale Dehydrogenase-Enzyme. Diese Umwandlung findet nur in lebensfähigen Zellen statt, da es toten Zellen an der notwendigen Stoffwechselaktivität fehlt. Das violette wasserunlösliche Formazanprodukt wird dann in DMSO gelöst und kann durch kolorimetrische Messung quantifiziert werden, wobei die Menge des gebildeten Formazans proportional zur Anzahl der lebensfähigen Zellen ist (223).

Plastikwaren und Lösungen, die mit MTT in Berührung kamen, wurden gesondert in einem MTT-Müll entsorgt, da MTT mutagen ist.

Zur Durchführung des MTT-Tests wurden die Zellen in einer 96-Well Platte in Triplikaten ausgesät (THP-1 Makrophagen: 0,04 Millionen Zellen/Well, U937 Makrophagen: 0,02 Millionen Zellen/Well) und stimuliert. Neben den Proben wurde zusätzlich eine Positivkontrolle eingeschlossen, bei der die Zellen mit 10 % DMSO in Zellkulturmedium inkubiert wurden. Außerdem blieb mindestens ein Well der 96-Well Platte leer, welches später bei der Auswertung als Blindwert diente. 4 Stunde vor Ende der Stimulationszeit wurden 25 µl der MTT-Lösung (Tabelle 2.35) mit einer Multikanalpipette zugefügt und unter Lichtausschluss für 4 Stunden im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurde der Überstand mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen und im MTT-Abfall entsorgt. Die gebildeten blauen Formazankristalle wurden durch Zugabe von 125 µl DMSO gelöst. Für die Ermittlung des Blindwerts wurden ebenfalls 125 µl DMSO in das leere Well gegeben. Mit einem Mikroplattenleser (Mithras2 LB 943) wurde die Absorption bei 540/10 BP gemessen. Zur Auswertung der Zytotoxizität wurden zunächst die Mittelwerte der Triplikate gebildet, von denen der Blindwert abgezogen wurde. Alle Werte wurden auf die unbehandelte Kontrolle bezogen (mit dem Wert 100 %).

2.4.3.4 LDH-Test

Wird die Zellmembran durch äußere Einflüsse oder den Zelltod beschädigt, können intrazelluläre Bestandteile, die eine intakte Zellmembran nur schwierig passieren können, vermehrt freigesetzt werden. Nach der Zellmembranschädigung liegen freigesetzte Bestandteile bei *in vitro* Zellanalysen im Zellkulturmedium vor. LDH ist ein Enzym, was normalerweise intrazellulär vorkommt und bei geschädigten Zellen in den Zellkulturüberstand freigesetzt wird. Damit ist der Test leicht im Labor durchführbar, da lediglich Zellkulturüberstände als Proben genommen werden müssen. Die LDH-Freisetzung kann mittels eines kolorimetrischen Tests bestimmt werden. Somit dient LDH als Marker für die Zellviabilität. Das LDH-Enzym kann über eine gekoppelte Enzymreaktion eine Substratlösung, die das gelbliche Tetrazolium-Salz INT enthält, zu einem roten Formazan-Salz umsetzen. Anhand dieser Farbreaktion kann der LDH-Gehalt im Zellkulturmedium ermittelt werden. Da die Stärke der Zellschädigung mit der LDH-Freisetzung und der damit verbundenen Farbreaktion korreliert, können Rückschlüsse auf den Grad der Zellschädigung gezogen werden (224). Zur Durchführung des LDH-Zellviabilitätstests wurde das CyQUANT LDH Zytotoxizitäts-Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Zunächst wurden die Zellen wie gewohnt in einer 24-Well Platte ausgesät und stimuliert. Zusätzlich zu den Proben wurden zwei Kontroll-Wells angesetzt. Für die Positivkontrolle wurden 25 µl Zellyse-Puffer und für die Messung der spontanen LDH-Freisetzung 25 µl pyrogenfreiem Wasser jeweils am Stimulationstag 45 Minuten vor Stimulationsende hinzugefügt. Nach Ende der Stimulationszeit wurde der Zellüberstand abgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und entweder direkt vermessen oder bis zur Vermessung bei -20 °C gelagert. Für den LDH-Test wurden 50 µl der Überstände in Duplikaten in eine 96-Well Zellkulturplatte pipettiert. Anschließend wurde mit einer Multikanalpipette 50 µl LDH-Reaktionsmix (Tabelle 2.36) hinzugefügt und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Durch Zugabe von 50 µl der im Kit enthaltenen Stopp-Lösung in jedes Well, wurde die Reaktion beendet. Mit einem Mikroplattenleser (Mithras2 LB 943) wurde die Absorption bei 492/10 BP gemessen. Zur Auswertung der Zytotoxizität wurden zunächst die Mittelwerte der Duplikate gebildet, von denen die spontane LDH-Ausschüttung subtrahiert wurde. Die Probenergebnisse wurden durch die Absorptionswerte der Positivkontrolle dividiert und in den prozentualen Anteil der lebenden Zellen umgewandelt.

2.4.4 ELISA-Analytik

Die quantitative Vermessung sezernierter Zytokine in den Zellkulturüberständen erfolgte mittels Sandwich-ELISA. ELISA steht dabei für *enzyme-linked immunosorbent assay* und ist eine häufig verwendete Methode in der Immunologie, um die Konzentration von Antigenen in einer Probe zu bestimmen. Das Prinzip des Sandwich-ELISA basiert auf einer indirekten Quantifizierung des Antigens durch Wechselwirkung des Antigens mit Biotin-konjugierten Antikörpern. Durch Bindung der Biotin-

konjugierten Antikörper an eine Streptavidin-gekoppelte HRP (*horseradish peroxidase*) wird nach Zugabe eines Substrates eine Substratumsetzung induziert, die eine Farbreaktion auslöst. Diese kann kolorimetrisch detektiert werden (225). Die Intensität der Färbung ist abhängig von der Konzentration des Zielantigens und kann mit Hilfe einer Standardgerade des Antigens berechnet werden.

Für die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen wurden Test-Kits von der Firma Thermo Fisher Scientific und 96-Well Platten mit einer speziell beschichteten Oberfläche (Nunc MaxiSorb 96 Well Platten) verwendet, sodass die Antikörper gut an der Plattenoberfläche binden konnten. Jedes Well wurde mit Hilfe einer Multikanalpipette mit 100 µl einer für das zu bestimmende Antigen spezifischen Fänger-Antikörperlösung befüllt. Um die Fänger-Antikörperlösung herzustellen, wurde der Beschichtungspuffer im Verhältnis 1:10 mit doppelt demineralisiertem Wasser vermischt und anschließend der Fänger-Antikörper im Verhältnis 1:250 zugegeben. Die Platte wurde anschließend mit Parafilm abgedeckt und bei 4 °C über Nacht gelagert, sodass nun die Antikörper auf der Oberfläche der Platte adsorbieren und nachfolgend das Zielantigen binden konnten. Am darauffolgenden Tag wurde mithilfe eines Plattenwaschgeräts (WellWash) die Fänger-Antikörperlösung entfernt und die Platte 3 Mal mit je 200 µl/Well ELISA-Waschpuffer (Tabelle 2.38) gewaschen. Im Anschluss an die Waschschrte, wurde die Platte kurz trockengeklopft. Anschließend wurden je 200 µl Blockierungspuffer pro Well mit einer Multikanalpipette zugegeben, um die Entwicklung unspezifischer Signale zu unterbinden. Der Blockierungspuffer (5x ELISA/ELISASPOT Diluent) wurde dafür zuvor 1:5 mit doppelt demineralisiertem Wasser verdünnt. Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und für mindestens 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Zeitgleich wurden die zu untersuchenden Zellkulturüberstände aus dem Gefrierschrank (-20 °C) entnommen und auf einem Plattenschüttler aufgetaut und, falls nötig, mit Blockierungspuffer verdünnt. Außerdem wurde der lyophilisierte zytokin-spezifische Standard mit der im Analysenzertifikat angegebenen Menge doppelt demineralisiertem Wasser rekonstituiert. Nach 15 Minuten auf dem Schüttler wurde mit dem Blockierungspuffer eine vom Hersteller definierte Verdünnungsreihe hergestellt. Nach erneutem 3 maligen Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µl des Standards und der Proben in Duplikaten auf die Platte pipettiert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen mit ELISA Waschpuffer erfolgte die Zugabe von 100 µl eines Biotin-gekoppelten Detektionsantikörpers, welcher das Zielantigen markierte. Dazu wurde der Detektionsantikörper 1:250 in Blockierungspuffer verdünnt. Nach einstündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut gewaschen. Anschließend wurden 100 µl je Well vom Avidin-HRP Konzentrat (1:250 in Blockierungspuffer) hinzugegeben, wodurch die Bindung am Detektionsantikörper vermittelt wurde. Nach dreißigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss und dreimaligem Waschen wurden anschließend 100 µl der TMB-Substratlösung pro Well pipettiert und für 5 bis 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert, sodass nun die oxidative Umsetzung des Chromogens erfolgte. Nach Aktivierung des TMB durch den Komplex aus HRP und Wasserstoffperoxid färbte sich dieses zu einem blauen Oxidationsprodukt, wobei die Intensität

der Färbung mit der Menge an HRP bzw. gebundenem Zielantigen korrelierte. Nachdem eine deutliche Abstufung der Färbung des Standards erkennbar war, wurde die Reaktion mit 50 μ l oder 100 μ l je Well (siehe Analysenzertifikat) ELISA-Stopp-Lösung (Tabelle 2.39) beendet. Die dabei entstehende pH-Wert Veränderung veranlasste einen Farbumschlag, dessen Intensität mittels Mikroplattenlesegerät (Mitrast LB 943: 450/10 BP, 560/10 BP) vermessen wurde. Die Absorptionswerte der Messungen mit den beiden Filtern wurden voneinander subtrahiert. Es wurden die Mittelwerte der Duplikate gebildet und der Blindwert abgezogen. Mithilfe der Geradengleichung, die sich aus der Messung der Standardverdünnungsreihe ergab, wurde der Zytokingehalt der Proben (in pg/ml) ermittelt.

2.4.5 Western Blot Analytik

Die Western Blot Technik dient dem qualitativen und halb-quantitativen Nachweis von Proteinen. Um die Proben zu erhalten, müssen die Zellen lysiert oder der Zellkulturüberstand aufkonzentriert werden. Anschließend erfolgt eine Quantifizierung der Proteinmenge. Danach werden die Proteine denaturiert und können im weiteren Schritt mittels Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Nachdem sich die Proteine aufgetrennt haben, erfolgt der eigentliche *Blotting* Schritt, wobei die Proteine z. B. im semi-dry Verfahren von dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen werden. Die auf der Membran immobilisierten Proteine können mittels Antikörpern, die spezifisch an das gesuchte Protein binden, detektiert werden. Dazu werden Sekundärantikörper verwendet, die an die Primärantikörper binden und die entweder mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt sind oder einen Fluoreszenzfarbstoff enthalten. Wird das Substrat ECL (erhöhte Chemilumineszenz) auf die Membran gegeben, setzt das Enzym HRP ECL im Basischen zu einem chemilumineszierenden Produkt um, welches mithilfe eines Geldokumentationssystems detektiert werden kann (226). Fluoreszenzantikörper können durch Vermessung im entsprechenden Fluoreszenzkanal ebenfalls detektiert werden.

2.4.5.1 Probenvorbereitung

Um die transfizierten HEK293 Zellen auf Protein zu untersuchen, wurden nach der Transfektion mit dem hp2X7-Rezeptor (Kapitel 2.2.6.2) 0,4 Millionen Zellen entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 5 Minuten mit 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen waren bereit für die Zelllyse.

Für die Untersuchung der Proteine wurden THP-1 Makrophagen wie beschrieben in einer 24-Well Platte ausdifferenziert und stimuliert. Für die Bestimmung der Proteinmenge in THP-1 Monozyten wurden 3 Millionen Zellen in eine 24-Well Platte ausgesät und mit einem Volumen von 750 μ l Stimulationslösung stimuliert. Im Anschluss an die Stimulation wurden die Suspensionszellen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in diesem

Fall ebenfalls auf Proteine untersucht. Dabei war es wichtig, dass die Zellen mit serumfreiem Zellkulturmedium stimuliert wurden, da das Medium im folgenden Verlauf nicht komplett entfernt werden konnte und das im Medium enthaltene Serum die Gesamtproteinmenge der Probe verfälschen kann. Für die Bestimmung der Proteine im Zellkulturüberstand, musste die Proteinmenge aufkonzentriert werden. Dazu wurden 500 µl des Überstands entnommen und auf einen Microcon Filter (Merck) überführt. Die Filter wurden in ein Reaktionsgefäß eingesetzt und für 20 bis 40 Minuten mit 14000 g bei 4 °C zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Der Filter wurde umgedreht in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 3 Minuten mit 1000 g zentrifugiert. 72 µl des Konzentrats wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, von dem 12 µl für die Proteinbestimmung verwendet wurden. Die restlichen 60 µl Konzentrat wurden mit 20 µl DTT/Lämmli-Mix (Tabelle 2.47) im Verhältnis 4:1 gemischt.

Für die Bestimmung der Proteine der Zellysate, wurde der Zellkulturüberstand abgesaugt und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. Zu den Zellen wurden pro Well oder 1,5 ml Reaktionsgefäß 50 µl RIPA-Puffer (Tabelle 2.45) hinzugefügt und für 30 Minute auf Eis auf dem Schüttler inkubiert. Mit einem Zellschaber wurden anschließend die Zellen abgeschabt und die Zellysate von den Platten in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten mit 11000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Für die Bestimmung der Proteinmenge wurde ein Teil des Überstands entnommen (siehe Kapitel 2.4.5.2). 30 µl vom verbliebenen Überstand wurden anschließend mit 10 µl DTT/Lämmli-Mix (Tabelle 2.47) im Verhältnis 4:1 (3 Teile Überstand + 1 Teil DTT/Lämmli) gemischt. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, wobei die Proteine denaturierten. Anschließend wurde die Probe auf Eis gekühlt, sodass das im DTT-Lämmli-Mix enthaltene SDS an die hydrophoben Regionen der Proteine binden konnte. Dadurch wurden die Proteine stark negativ geladen. Die Ladung ermöglichte die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld (226). Nachdem die Proben heruntergekühlt waren, wurden sie für 5 Minuten mit 11000 g bei 4 °C zentrifugiert und konnten direkt für die Gelelektrophorese verwendet werden oder bei -20 °C gelagert werden.

2.4.5.2 Bestimmung der Proteinmenge

Die Bestimmung der Gesamtproteinmenge erfolgte im Anschluss mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits. Dabei bildet das BCA einen wasserlöslichen Chelat-Komplex mit den Proteinen, der Licht einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert und der anhand einer Standardreihe quantifiziert werden konnte. Der Standard wurde nach Herstellerangaben mit RIPA-Basalpuffer (Tabelle 2.44) hergestellt. Damit die Proteinmenge der Proben innerhalb des Standards lag, mussten die zuvor generierten Proben (Kapitel 2.4.5.1) entsprechend mit RIPA-Basalpuffer verdünnt werden. Anschließend wurden die verdünnten Proben sowie der Standard in Duplikaten auf eine 96-Well Platte pipettiert und für 30 Minuten bei 37° C und weiteren 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die

Platte unter Anwendung eines Mikroplattenlesers (Mitras² LB 943: 560/10) vermessen und die entsprechenden Konzentrationen durch Abzug des Blindwerts und mit Hilfe der Geradengleichung des Standards ermittelt.

2.4.5.3 SDS-PAGE (Gelelektrophorese)

Im Anschluss an die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde zunächst eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt, bei der Proteine anhand ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt wurden.

Dafür wurden die Gele (Tabelle 2.49, Tabelle 2.50) in die Elektrophoresekammer (Gelelektrophoresesystem Mini-PROTEAN Tetra Cell) überführt und die Kammer mit Laufpuffer (1x) (Tabelle 2.52) aufgefüllt. Der Kamm wurde gezogen und die Taschen mit je 20 oder 30 µg Protein beladen. Zur Identifikation der Größe der Proteine wurde 3 µl einer vorgefärbten Proteinleiter (Protein Leiter VI (10-245) der Firma AppliChem) in eine Tasche auf jedem Gel mit aufgetragen.

Bis sich die Proben im Sammelgel konzentriert hatten, wurde eine Anfangsspannung von 100 V angelegt. Danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht und der Trennungsprozess begann. Nachdem die Bromphenol-Blau Bande des Ladepuffers das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Spannung abgestellt. Das Gel wurde entnommen und mit Hilfe des Geldokumentationssystems (ChemiDoc Imager unter der Einstellung Stain-free Gel) aktiviert. Diese Aktivierung ist essenziell, um später die Gesamtproteinmenge auf der Membran zu detektieren. Sie bewirkt eine Aktivierung von Trihalogenverbindungen im Gel, die mit Tryptophanresten der Proteine ein Addukt bilden, welches Fluoreszenz emittieren kann (227,228). Das Gel wurde anschließend in Transferpuffer (1x) (Tabelle 2.54) zwischengelagert.

2.4.5.4 Proteintransfer

Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Membran, die schlussendlich mit den jeweiligen Antikörpern detektiert werden. Für den Transfer wurde eine PVDF-Membran verwendet, auf der Proteine gut binden können (229). Je nachdem, welche Proteine detektiert werden sollten, wurde eine PVDF-Membran mit unterschiedlicher Porengröße verwendet. In dieser Arbeit wurde zur Detektion der Cleaved-Caspase-1 und Cleaved-IL-1β in Überstandproben die PVDF-Membran mit 0,2 µm Porengröße verwendet. Für alle anderen Versuche wurde eine Porengröße von 0,45 µm gewählt.

Die PVDF-Membranen wurden auf die Größe der Gele zugeschnitten und anschließend über drei Aktivierungsschritte äquilibriert, damit die hydrophobe PVDF-Membran mit dem hydrophilen Transferpuffer und der Antikörperlösung benetzt werden konnte. Dafür wurde die Membran für 20 Sekunden in 100%igem Methanol, 2 Minuten in demineralisiertem Wasser und abschließend 5 bis 15 Minuten in Transferpuffer inkubiert. In der Zwischenzeit wurden pro Gel zwei passende Filterpapiere (*Blotting*

Pads) zurechtgeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte mit dem Trans-Blot Turbo Transfersystem der Firma BioRad in einem *Semi-Dry* Verfahren. In die Kassette des Transfersystems wurde zuerst ein Filterpapier, darauf die Membran, dann das entsprechende Gel und abschließend wieder ein Filterpapier geschichtet. Mit einer Rolle wurden Luftblasen zwischen Gel und Membran entfernt und der Transfer mit dem Standardprogramm (25 V, 1 A, 30 Minuten) gestartet. Anschließend wurden die Gele entsorgt und die Membran 3 Mal für 5 Minuten mit ca. 10 ml TBS-T-Puffer (Tabelle 2.57) gewaschen. Danach wurde die Gesamtproteinmenge mit dem Geldokumentationssystem gemessen. Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde mit 10 ml 5%iger Milch in TBS-T Lösung (Tabelle 2.58) auf dem Wippschüttler inkubiert. Dieser Blockierungsschritt war nötig, um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu verhindern. Anschließend wurde die Membran 3 Mal mit TBS-T-Pufferlösung gewaschen (siehe oben) und dann über Nacht mit 10 ml der jeweiligen spezifischen primären Antikörperlösung (Tabelle 2.61) inkubiert. Bevor der sekundäre Antikörper inkubiert werden konnte, mussten die Membranen erneut dreifach mit TBS-T-Puffer gewaschen werden.

Je nachdem, welcher Primärantikörper genutzt wurde, wurde die Membran mit 10 ml HRP-gebundener Sekundärantikörperlösung oder Fluoreszenz-Antikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Wippschüttler inkubiert und abschließend dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen.

Wurde ein HRP-gebundener Sekundärantikörper genutzt, wurde die Membran mit ECL-Lösung benetzt und für 30 Sekunden inkubiert. Im Geldokumentationsgerät (ChemiDoc Imager) wurden alle 30 Sekunden Chemilumineszenz-Bilder aufgenommen, bis die Banden gesättigt waren. Wurde ein Fluoreszenz-Antikörper als Sekundärantikörper verwendet, konnte die Membran direkt nach dem Waschen in das Geldokumentationssystem (ChemiDoc Imager) gelegt werden. Fotos wurden im entsprechenden Fluoreszenzkanal aufgenommen. Zusätzlich wurde ein Foto der Protein Leiter aufgenommen. Die Membran wurde im Anschluss daran 3 Mal mit TBS-T-Puffer gewaschen und konnte anschließend erneut mit einer Primärantikörperlösung inkubiert werden. Eine densitometrische Bestimmung der Banden erfolgte mit Hilfe der Software ImageLab. Die Banden der einzelnen Proben wurden auf die Gesamtproteinmenge bezogen und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle relativiert.

2.4.6 PCR-Analytik

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Analytik erlaubt eine gezielte Betrachtung des zellulären Genoms durch Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente (230). Unter Verwendung sequenzspezifischer Primer und definierten Temperaturprogrammen in Anwesenheit von Fluoreszenzfarbstoffen kann das Prinzip der Genamplifikation auch zur quantitativen Analyse (quantitative PCR, qPCR) eingesetzt werden. Die qRT-PCR (quantitative reverse Transkriptions-

Polymerase-Kettenreaktion) ist eine Technik zur Messung der Genexpression durch Quantifizierung der RNA-Menge in einer Probe. Das Prinzip der qRT-PCR umfasst die Umwandlung von RNA in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) durch reverse Transkription, gefolgt von der Amplifikation der cDNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und dem Nachweis des amplifizierten Produkts in Echtzeit. Hierfür musste zuerst RNA aus den Proben isoliert werden, die dann im nächsten Schritt in cDNA umgeschrieben wurde.

In den folgenden Arbeitsschritten wurden Verbrauchsmaterialien genutzt, die DNase- und RNase--frei sind, damit sichergestellt werden konnte, dass die RNA und DNA nicht durch diese Enzyme abgebaut wurden. Es wurden 1,5 ml Reaktionsgefäße (PCR-rein) und Filterspitzen genutzt. Außerdem war das verwendete Wasser PCR-rein.

2.4.6.1 RNA-Isolation

Die für die qRT-PCR Analyse verwendeten Zellen wurden in einer 24-Well Platte ausgesät (0,4 Millionen Zellen pro Well) und wie oben beschrieben differenziert. Nach erfolgter Stimulation wurde der Überstand entfernt und je 400 µl Lyse-Puffer (Lysis Solution RL) hinzugegeben. Die Platte wurde für 2 Minuten inkubiert, das Lysat mithilfe einer 1000 µl Pipette homogenisiert und weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in je einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) gesammelt und konnte bei -80 °C gelagert werden.

Die anschließende Isolierung der RNA erfolgte unter Verwendung des innuPREP RNA Mini Kits (Analytik Jena) nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurden das Lysat auf die dem Kit zugehörigen blauen Spin-Filter D überführt, für 2 Minuten mit 11000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und in einem entsprechenden RNase-freien Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde das Filtrat mit 400 µl 70%igem Ethanol in DEPC-Wasser (Tabelle 2.63) gemischt und in den pinken Spin-Filter R übertragen. Während für 2 Minuten mit 11000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert wurde, fand die Bindung der RNA und DNA an die Säulenmatrix statt. Das Filtrat wurde verworfen und in den Spin-Filter R wurden 500 µl Washing Solution HS gegeben und erneut 1 Minute mit 11000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem der Spin-Filter auf neue Auffang-Reaktionsgefäße übertragen wurde, wurde die Spin-Filter R Säule erneut mit 700 µl Washing Solution LS gewaschen und anschließend für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Spin-Filter R auf ein neues Auffang-Reaktionsgefäß gegeben und 3 Minuten mit 11000 g zentrifugiert, um das Ethanol zu entfernen. Das Filtrat wurde erneut verworfen und der Spin-Filter R auf einem neuen Eluierungs-Reaktionsgefäß platziert. In den Spin-Filter R wurden 60 µl RNase-freies Wasser (PCR-rein) pipettiert, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 1 Minute bei 11000 g zentrifugiert. Das Filtrat enthielt nun die RNA und konnte bei -80 °C gelagert werden.

2.4.6.2 cDNA-Synthese

Mittels des iScript cDNA-Synthese Kits erfolgte die anschließende Umschreibung der isolierten RNA in cDNA. Durch das Enzym Reverse Transkriptase wird in einer PCR die cDNA gebildet und amplifiziert. Dafür wurde zuerst ein Mastermix mit denen im Kit enthaltenen Bestandteilen hergestellt. Pro Probe wurden dazu 3,5 µl nuklease-freies Wasser mit 2 µl 5x iScript Reaktionsmix und 0,5 µl iScript Reverse Transkriptase in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) gemischt. Der Mastermix wurde auf Eis gelagert. Anschließend wurden je 6 µl des Mastermix in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß pipettiert und jeweils 4 µl RNA-Probe zu dem Mastermix hinzugefügt. Die Reaktionsgefäße wurden kurz mit der Tischzentrifuge zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße in den Heizblock des qTowers überführt und die PCR-Reaktion nach folgendem Temperaturprogramm gestartet:

Tabelle 2.76: Temperaturprotokoll für die cDNA-Synthese

Schritt	Temperatur und Zeit
Initialschritt	25 °C, 5 min
Reverse Transkription	46 °C, 20 min
Reverse Transkriptase Inaktivierung	95 °C, 1 min
	4 °C, halten

Nach erfolgter cDNA-Synthese wurden die Proben mit 30 µl Wasser (PCR-rein) aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und im Gefrierschrank (-20 °C) gelagert.

2.4.6.3 qPCR

Die qPCR diente als Methode der Quantifizierung des Gehalts an mRNA (*messenger ribonucleic acid*) in den zu untersuchenden Zellen, wobei dies indirekt über die synthetisierte cDNA Menge geschah. Insgesamt verläuft die Polymerase Kettenreaktion in 3 Schritten. Zuerst erfolgt durch hohe Temperaturen die Denaturierung, bei der sich die DNA-Doppelstränge voneinander trennen. Anschließend wird die Temperatur gesenkt, sodass eine optimale Anlagerung der sequenzspezifischen Primer an die einsträngige DNA erfolgt. Primer sind kurze DNA-Fragmente und markieren den Startpunkt der Sequenz, die abgelesen werden soll. Im dritten Schritt erfolgt die Polymerisation neuer DNA-Doppelstränge, beginnend am 3'-Ende des Primers. Dafür baut die DNA-Polymerase einzelne Nukleotide an die Primer an. Um die Menge an synthetisierter DNA am Ende jedes Zyklus zu messen, wird der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green hinzugefügt. SYBR Green bindet an doppelsträngige DNA und sendet so ein messbares Fluoreszenzsignal aus. Die Signalintensität korreliert dabei mit der Menge an Nukleinsäuren und ermöglicht daher die Quantifizierung in Echtzeit (231).

Zuvor wurden die verwendeten Primerpaare hierfür entsprechend der gewünschten PCR-Produktgröße und Primer-Schmelztemperatur mittels Gendatenbanken (Primer-BLAST) ermittelt. Für die qPCR wurden lyophilisierte Primer mit PCR-Wasser in einer finalen Konzentration von 10 µM rekonstituiert. Zuerst wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) ein Mastermix hergestellt, der 2 µl Wasser (PCR-rein), 0,5 µl der jeweiligen Vorwärts- und 0,5 µl der Rückwärts-Primerlösung (10 µM), sowie 5 µl iTaq SYBR Green Supermix (2x konzentriert, BioRad) enthielt. Der iTaq SYBR Green Supermix enthielt neben des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I eine DNA-Polymerase, Nukleotide und Magnesiumionen. Die verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 2.4 angegeben.

2 µl der cDNA Proben wurden mit 8 µl des Mastermixes in einer 96-Well Platte (weiß, PCR-rein) in Duplikaten pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und 2 Minuten mit 400 g bei 4 °C zentrifugiert. Daraufhin wurden die Proben im qTOWER vermessen, wobei einem 5-minütigen Initialschritt bei 95 °C insgesamt 45 Amplifikationszyklen folgten. Die Amplifikationszyklen umfassten dabei jeweils eine 10-sekündige Denaturierung bei 95 °C, Anlagerung von Primern bei 60 °C und Elongation bei 72 °C (Tabelle 2.77). Im Anschluss erfolgte die Analyse der Schmelzkurven, die der Bestätigung der Primerspezifität und der Kontrolle möglicher Primerdimere diente.

Tabelle 2.77: Temperaturprotokoll für die qPCR

Schritt	Temperatur und Zeit
Vorheizen	100 °C
Initialschritt	95 °C, 5 min
Denaturierung	95 °C, 10 sek
Anlagerung Primer	60 °C, 10 sek
Elongation	72 °C, 10 sek
Schmelzkurve	60 – 95 °C, 15 sek, 1 °C/s

} 45 Zyklen

Die Auswertung der qPCR-Daten erfolgte unter Verwendung der Software qPCRsoft 4.1 nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode vergleicht die Differenz der Expression (ΔCt) zwischen dem gewünschten Gen und dem Referenzgen (GADPH). Dabei wird der Ct-Wert des Referenzgens vom Ct-Wert der gewünschten Gens abgezogen ($=\Delta\text{Ct}$). Anschließend wird die Differenz zwischen der unbehandelten Kontrolle und der behandelten Probe gebildet ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Die relativen Veränderungen der Genexpression zwischen den beiden verglichenen Sequenzen werden mit der Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ berechnet (232).

2.4.1 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) liefert Informationen über die Sequenz und Menge jeder RNA, die in einer Zellpopulation exprimiert wird (das so genannte Transkriptom). Das Prinzip der RNA-Seq in der *next generation sequencing* (NGS) basiert auf der Synthese von cDNA aus RNA und der anschließenden

Sequenzierung der cDNA-Fragmente. Die Sequenzdaten werden mithilfe von Bioinformatik-Tools analysiert, um die RNA-Expression zu quantifizieren (233). Durch die Anwendung der RNA-Seq bei Zellen, die verschiedenen Bedingungen ausgesetzt wurden, liefert die differenzielle Genanalyse Ausschluss darüber, welche Gene bei unterschiedlichen Bedingungen hoch- oder runterreguliert werden. Hierbei werden die Reads von jeder Probe verglichen. Die Menge an RNA, die von jedem Gen in jeder Probe vorhanden ist, wird normalisiert, um die Unterschiede in der Gesamtmenge an RNA zwischen den Proben auszugleichen. Anschließend werden statistische Methoden verwendet, um signifikante Unterschiede in der Expression von Genen zwischen den Proben zu identifizieren, die anschließend graphisch dargestellt werden können (234).

Für die RNA-Seq wurden THP-1 Makrophagen wie beschrieben ausdifferenziert und stimuliert. Nach der Stimulation wurde der Zellkulturüberstand entfernt, die Zellen lysiert und die RNA mittels des innuPrep RNA Mini Kits (Analytik Jena) isoliert. Der Prozess der RNA-Proben generierung ist in Kapitel 2.4.6.1 beschrieben. Die isolierten RNA-Proben wurden mittels UV/Vis Spektroskopie (Nanodrop) vermessen. Dadurch wurde sowohl die Konzentration sowie das A260/A280-Verhältnis und das A260/A230-Verhältnis bestimmt, was die Reinheit der Proben sicherstellte. Ein vermindertes Verhältnis deutet auf Verunreinigung der Proben mit Salzen oder Phenolen hin und kann die Effizienz der RNA-Seq beeinflussen. Bei der Expressionsanalyse mittels 3'-mSequenzierung wird von allen Proben eines Projektes die gleiche Inputmenge eingesetzt. Daher müssen die Proben auf eine ungefähr gleiche Konzentration eingestellt werden. Nachdem die Konzentration der Proben mittels Nanodrop bestimmt wurde, wurden bei Bedarf einzelne Proben mit Wasser (PCR-rein) verdünnt, sodass alle Proben eine Konzentration zwischen 40 und 60 ng/ μ l hatten. Je 14 μ l der jeweiligen Probe wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (PCR-rein) überführt und bei -80 °C gelagert.

Die Vermessung der Proben erfolgte durch die *NGS (next generation sequencing) Core Facility* des Instituts für Humangenetik der Universitätsklinik Bonn. Die Library Prep erfolgte mit dem Lexogen QuantSeq 3' mR Library Prep Kit FWD und mit 200 ng RNA als Input. Sequenziert wurde mit 1x100 bp auf NovaSeq 6000 S1 100 Flow cell und mit 10 Millionen reads pro Proben. Die Auswertung der generierten Daten wurde durch die *Core Unit for Bioinformatics Data Analysis* der Universitätsklinik Bonn durchgeführt. Nach dem Trimmen des Illumina Universal Adapters mit cutadapt (235) wurden die Reads mit STAR (236) an das menschliche Genom (GRCh38) angeglichen. FeatureCounts (237) wurde verwendet, um die Reads den von Ensembl definierten Genen zuzuordnen. Ein Read wurde gezählt, wenn er sowohl eindeutig zugeordnet war, mit dem Strang des Gens übereinstimmte und sich mit nur einem Gen überschneidete. Nur Gene, die in mindestens 2 Proben jeweils eine Mindestanzahl von 50 aufwiesen, wurden in der darauffolgenden statistischen Analyse berücksichtigt, die in der R-Umgebung (238) mit dem Bioconductor-Paket DESeq2 (239,240) durchgeführt wurde. Für jedes Gruppenpaar wurden statistische Unterschiede berechnet, um differenziell exprimierte Gene zu bestimmen. Die Benjamini-Hochberg-Methode wurde verwendet, um bereinigte p-Werte für Mehrfachtests (Falscherkennungsrate,

false discovery rate, FDR) für jeden Unterschied zu berechnen. Datenvisualisierungen wie Volcanoplots und Heatmaps wurden mit den R-Paketen ggplot2 (241) und ComplexHeatmap (8) erstellt. Die Anreicherungsanalyse von biologischen Prozessen für differenziell exprimierte Gene (FDR < 0,05, Fisher-Test) wurde mit dem Bioconductor-Paket clusterProfiler (242) durchgeführt. Es wurden nur biologische Prozesse mit einer Setgröße von mindestens 10 oder höchstens 500 Genen berücksichtigt.

2.4.2 Calcium Assay

Der Calcium Assay ist ein fluoreszenzbasierter Test, mit dem der Einstrom von Calciumionen in das Zytoplasma verfolgt werden kann. Die Messung des Calcium-Einstroms beruht auf der Messung der Fluoreszenzintensität des Calcium-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Fluo-4 (243). Dafür wurden die Zellen mit dem zellpermeablen Calciumindikator Fluo-4 Acetoxymethylester (Fluo-4 AM) beladen. Durch intrazelluläre Esterasen wird Fluo-4 AM in das fluoreszierende Fluo-4 gespalten, das intrazellulär an Calcium bindet und ein Anregungs-/Emissionsmaximum von 490/520 nm aufweist. Eine Bindung von Fluo-4 an Calcium-Ionen erhöht die Fluoreszenzintensität (244). Eine Messung der Änderung der Fluoreszenzintensität bietet damit Rückschlüsse auf den Calcium-Einstrom. Die Messung erfolgte mit der FlexStation. Die FlexStation ist ein Mikroplattenlesegerät, das die Fluoreszenzintensität über einen gewissen Zeitraum misst. Ein eingebauter 8-Kanal Pipettierroboter ermöglichte die automatisierte zeitgesteuerte Zugabe von Stimulationslösung aus einer 96-Well Platte in die 96-Well Testplatte. Daher eignete sich die FlexStation für kinetische Messungen der Fluoreszenzintensitätsänderung.

Die Aktivierung verschiedener Purinrezeptoren, unter anderem des P2X7-Rezeptors, führt zu einem direktem Calcium-Einstrom in die Zelle. Durch Zugabe von verschiedenen rezeptorspezifischen Inhibitoren oder unter Verwendung von transfizierten Zellen, können durch Messung der Fluoreszenzintensitätsänderung Rückschlüsse auf die P2X7-Rezeptoraktivierung gezogen werden (243). Um die Aktivität von Ap4 am P2X7-Rezeptor zu untersuchen, wurde daher der Calcium-Einstrom in der vorliegenden Arbeit in THP-1 Monozyten, THP-1 Makrophagen und hP2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen gemessen. Dazu wurden die Zellen in schwarzen 96-Wellplatten mit klarem Boden (Corning) kultiviert, die zuvor mit Polylysin beschichtet wurden (Kapitel 2.2.1). Anschließend wurden die Zellen mit Fluo-4 beladen und die Fluoreszenzintensitätsänderungen der Zellen wurden in Echtzeit vor und während der Zugabe verschiedener stimulierender Verbindungen mit der FlexStation gemessen. HEK293 Zellen wurden mit dem pUNO1-hP2RX7 oder pUNO-mcs transfiziert und anschließend in ein Röhrengefäß überführt und zentrifugiert (Kapitel 2.2.6.2). Nach der Zentrifugation wurde frisches Wachstums- und Stimulationsmedium für HEK293 (Tabelle 2.18) hinzugegeben, sodass eine Zellkonzentration von 1 Millionen Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Je 100 µl der Zellsuspension wurden mit einer Multikanalpipette pro Well in eine schwarze Polylysin-beschichtete 96-Wellplatte (Kapitel 2.2.1) überführt, sodass pro Well 0,1 Millionen Zellen enthalten waren. Die Messung erfolgte

in Duplikaten und es wurde darauf geachtet, dass Kontroll-Well für die ungefärbte Kontrolle (ohne Farbstoffladepuffer, unstimuliert), die Negativkontrolle (mit Farbstoffladepuffer, unstimuliert) und Positivkontrolle (mit Farbstoffladepuffer, stimuliert mit Calcimycin 10 μM) eingeschlossen wurden. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Wurden statt transfizierter HEK293 Zellen THP-1 Makrophagen verwendet, so wurden THP-1 Monozyten direkt in einer schwarzen Polylysin-beschichteten 96-Well Platte ausdifferenziert (Kapitel 2.2.2.2). Dafür wurde eine Zellkonzentration von 0,5 Millionen THP-1 Monozyten pro Milliliter mit 25 ng/ml PMA hergestellt und 200 μl der Lösung in die 96-Well Platte ausgesät, sodass in jedem Well 0,1 Millionen Zellen enthalten waren. Nachdem die THP-1 Makrophagen ausdifferenziert waren oder nachdem die 24-stündige Inkubationszeit der HEK293 Zellen abgelaufen war, wurde das alte Medium abgesaugt und 40 μl Farbstoffladepuffer (Tabelle 2.66) pro Well zugefügt. In die ungefärbte Kontrolle wurden statt des Farbstoffladepuffer 40 μl Calcium-Waschpuffer (Tabelle 2.65) gegeben. Wurden THP-1 Monozyten für die Messung des Calcium-Einstroms verwendet, so wurde die benötigte Zellmenge während des Passagierens in ein 50 ml Röhrengefäß überführt und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Farbstoffladepuffer resuspendiert, sodass eine Zellkonzentration von 2,5 Millionen Zellen pro Milliliter erreicht wurde. Pro Well wurden 40 μl der Zellsuspension in eine schwarze Polylysin-beschichtete 96-Well Platte überführt, sodass ebenfalls pro Well 0,1 Millionen Zellen enthalten waren. Die Zellen wurden jeweils für eine Stunde in Farbstoffladepuffer bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die Stimulationslösungen hergestellt. Dazu wurden die Stimulationsreagenzien in Waschpuffer gelöst, sodass eine 4-fache Konzentration der gewünschten Endkonzentration erreicht wurde. Als Positivkontrolle wurde das Calcium-Ionophor Calcimycin (Endkonzentration 10 μM) verwendet, das die intrazellulären Calciumspiegel erhöht (245). Je 250 μl der Stimulationslösung wurden in eine 96-Well Platte mit V-Boden überführt. Bei der Messung wurden mit dem Pipettierroboter der FlexStation später 50 μl der Stimulationslösung zu den Zellen mit 150 μl Waschpuffer hinzugefügt, sodass die gewünschte Endkonzentration erreicht wurde.

Nach Ablauf der einstündigen Inkubationszeit mit Farbstoffladepuffer, wurde der Überstand vorsichtig mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen. THP-1 Monozyten wurden davor 5 Minuten mit 200 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, um sicherzustellen, dass die THP-1 Monozyten sedimentieren. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, wurden 150 μl Calcium-Waschpuffer (Tabelle 2.65), der gegebenenfalls auch die Inhibitoren in der gewünschten Konzentration enthielt, zugefügt. Waren Inhibitoren enthalten, wurde die Platte erneut 30 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit den Zellen, sowie die Platte mit der Stimulationslösung in die FlexStation gestellt und die Fluoreszenzmessung (Extinktion: 490, Emission: 525 nm, Cutoff: 515 nm) konnte gestartet werden. Im Zeitintervall von 1,5 Sekunden wurde eine kinetische Messung durchgeführt und die Änderung der Fluoreszenzintensität gemessen. Die Fluoreszenzintensität wurde in einer relativen

Einheit, der RFU (*relative fluorescence unit*), ausgegeben. Bei der Messung wurde eingestellt, dass 50 μ l der Stimulationslösungen nach 20 Sekunden der Platte zugefügt wurden.

2.5 Statistik

Bis auf wenige Ausnahmen wurden die Daten von mindestens 3 unabhängigen Experimenten zusammengefasst und als Mittelwerte + SEM ausgedrückt. Die statistische Analyse wurde mit der Software GraphPad Prism 9 durchgeführt. Bei Mehrfachvergleichen wurden statistisch signifikante Unterschiede durch eine einfaktorielle Varianzanalyse, gefolgt von einem Dunnett-, Tukey- oder Bonferroni-Test, ermittelt und bei *P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001, ****P \leq 0,0001 als signifikant angesehen. Für die Untersuchung der hemmenden Wirkung verschiedener Inhibitoren wurde die Ap4-, ATP-, BzATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung auf 100 % gesetzt. Alle anderen Werte wurden entsprechend berechnet. Statistische Unterschiede wurden durch einen t-Test mit einer Stichprobe gegen 100 % bewertet.

Bezüglich der durchflusszytometrischen- bzw. Western Blot Analysen wurden ausschließlich repräsentative Darstellungen ausgewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der P2X7-Rezeptor-vermittelten IL-1 β -Freisetzung

Der purinerge P2X7-Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle bei Infektionen, Entzündungen und Zelltod. Der nichtselektive Ionenkanal wird durch den endogenen Liganden ATP aktiviert. Im Folgenden wurde der Signalweg der P2X7-Rezeptor-abhängigen IL-1 β -Freisetzung in humanen Zellen untersucht. Um mögliche Nebeneffekte durch hohe ATP-Konzentrationen auszuschließen, wurde auch BzATP, ein potenterer P2X7-Rezeptoragonist (80,81) verwendet. Da Nigericin die IL-1 β -Freisetzung unabhängig vom P2X7-Rezeptor induziert, diente es als Referenzsubstanz.

3.1.1 IL-1 β -Freisetzung in PBMCs

Im ersten Schritt wurde die IL-1 β -Freisetzung in PBMCs untersucht. Hierfür erfolgte ein *Priming* mit oder ohne den TLR2/1-Liganden Pam₃CSK₄. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit ATP, BzATP und Nigericin. ATP, BzATP und Nigericin führten zu einer Erhöhung der IL-1 β -Freisetzung in PBMCs. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Freisetzung von IL-1 β nur möglich war, wenn vor der Stimulation ein *Priming* mit Pam₃CSK₄ erfolgte (Abbildung 3.1 A). Neben der Freisetzung von IL-1 β wird über die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung auch die Caspase-1-vermittelte Pyroptose ausgelöst (9,50). Der pyroptotische Zelltod wurde anhand der Freisetzung des endogen vorkommenden Enzyms LDH gemessen (246). ATP, BzATP und Nigericin erhöhten folglich die LDH-Freisetzung in Pam₃CSK₄-geprimten PBMCs um 24 %, 12 % bzw. 31 % im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.1 B).

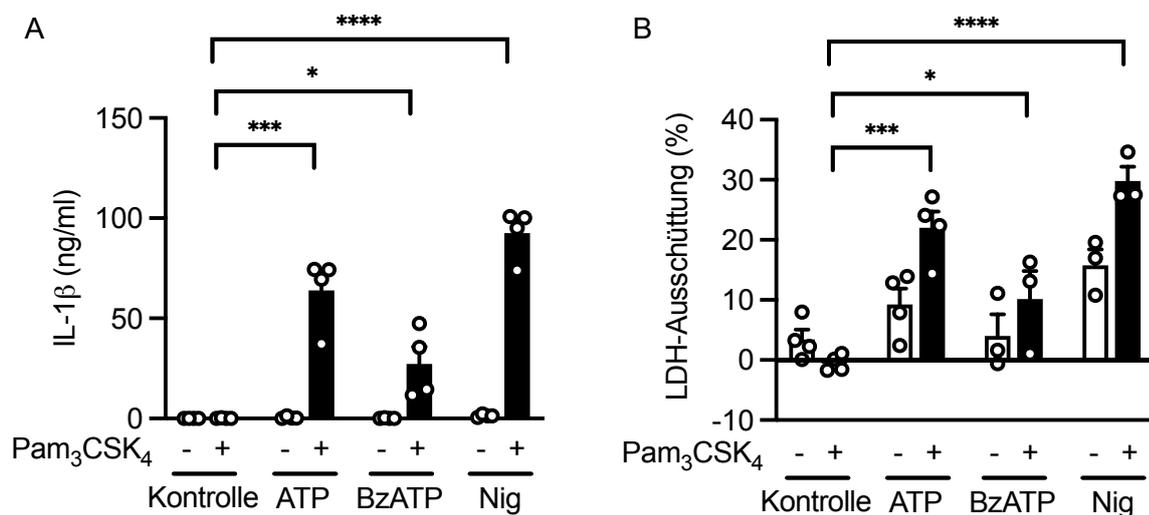


Abbildung 3.1: Pam₃CSK₄ Priming von PBMCs ist für die Freisetzung von IL-1 β unerlässlich. (A und B) PBMCs wurden ohne oder mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden ohne oder mit ATP (5 mM), BzATP (300 μ M) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden (A) mittels ELISA auf die IL-1 β Konzentration und (B) auf die LDH-Freisetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in % der

Um die Bioaktivität des sezernierten IL-1 β zu bestätigen, wurden die Überstände von stimulierten THP-1 Makrophagen zu HEK293 Reporterzellen gegeben (Abbildung 3.3 B), die den IL-1-Rezeptor exprimieren und mit einem NF- κ B/AP-1-induzierbaren Reporter für sekretierte embryonale alkalische Phosphatase (SEAP) transfiziert sind (218). Die Bindung von bioaktivem IL-1 β an den IL-1 Rezeptor der HEK293 Reporterzellen, aktiviert die NF- κ B/AP-1 Signalkaskade, welches mit der Sekretion von SEAP einhergeht, die sich in einer kolorimetrischen Verschiebung und einer erhöhten Absorption des Detektionsmediums manifestiert. Überstände von Pam₃CSK₄-geprimten THP-1 Makrophagen, die mit ATP und BzATP stimuliert wurden, führten zu einem signifikanten Anstieg der Absorption (Abbildung 3.3 B). Dies bestätigt, dass ATP und BzATP die Freisetzung der bioaktiven Form von IL-1 β induzieren. Obwohl Nigericin die Freisetzung von IL-1 β in THP-1 Makrophagen stark induzierte, konnte kein signifikanter Anstieg der Absorption im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Der ausbleibende Anstieg der Absorption könnte durch zytotoxische Effekte des im Überstand verbleibenden Nigericins auf die HEK293 Reporterzellen erklärt werden.

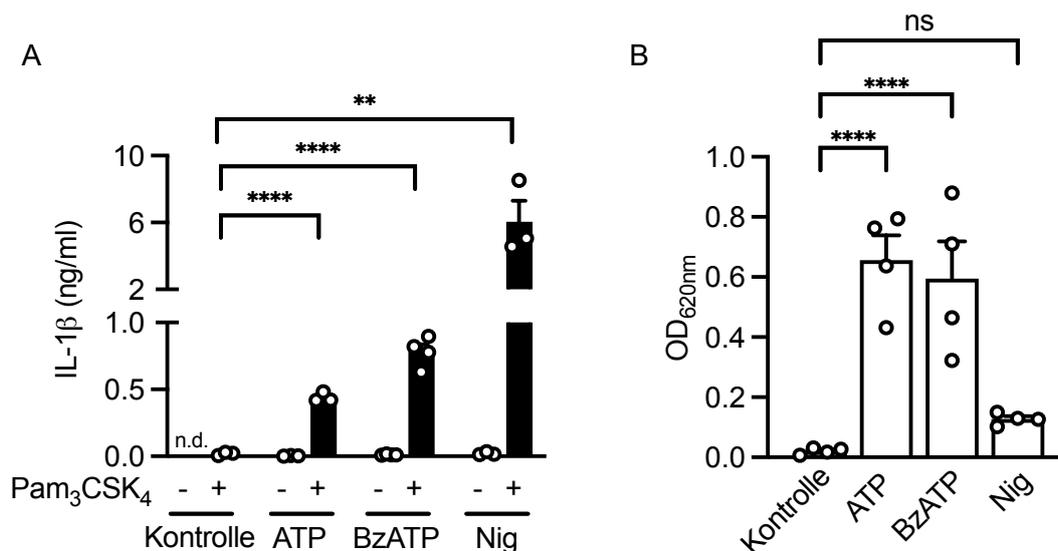


Abbildung 3.3: Priming von THP-1 Makrophagen ist für die Freisetzung von bioaktivem IL-1 β unerlässlich. THP-1 Makrophagen wurden ohne oder mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden ohne oder mit ATP (5 mM), BzATP (300 μ M) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. (A) Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. (B) Die Zellkulturüberstände der stimulierten THP-1 Makrophagen wurden auf HEK293 Reporterzellen übertragen. Die SEAP-Produktion wurde mit QUANTI-Blue nachgewiesen und die optische Dichte bei 620 nm gemessen. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, * $P \leq$ 0.05, ** $P \leq$ 0.01, *** $P \leq$ 0.001, **** $P \leq$ 0.0001, (A) ungepaarter t-Test, (B) einfaktorielles Varianzanalyse gefolgt von Dunnett. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

3.1.2 Die P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Sekretion ist weitgehend NLRP3-unabhängig

Um festzustellen, ob ATP die Freisetzung von IL-1 β über den P2X7-Rezeptor vermittelt, wurde der Einfluss verschiedener P2X7-Rezeptorantagonisten getestet. BzATP diente als Referenzsubstanz. Die ATP- und BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung wurde in Gegenwart der selektiven P2X7-Rezeptorantagonisten A804598 und oxATP gehemmt (Abbildung 3.4 A und B). Jedoch war die Hemmung der ATP-induzierten Zytokinfreisetzung durch den irreversiblen Antagonisten oxATP weniger stark ausgeprägt, als durch den nicht-kompetitiven reversiblen Antagonisten A804598 (248,249). Da es bereits Studien gibt, die zeigen, dass der P2X4-Rezeptor an der Inflammasom-Aktivierung in Mäusen beteiligt ist (250,251), wurde untersucht, ob neben dem P2X7-Rezeptor auch noch andere Purinrezeptoren an der IL-1 β -Freisetzung in Humanzellen beteiligt sind. Deshalb wurde der Einfluss des spezifischen P2X4-Rezeptorantagonisten 5-BDBD (252) und des P2-Rezeptorantagonisten PPADS (253,254) auf die IL-1 β -Freisetzung getestet. Die Zugabe von 5-BDBD verringerte die ATP- und BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nicht (Abbildung 3.4 C). Durch PPADS wurde die Freisetzung von IL-1 β durch mit ATP- und BzATP-stimulierte Makrophagen auf 60,6 % bzw. 4,2 % gesenkt (Abbildung 3.4 D). Wie erwartet, wurde die IL-1 β -Freisetzung, die durch das Kaliumionophor Nigericin vermittelt wurde, durch keinen der getesteten P2X-Rezeptorantagonisten beeinflusst.

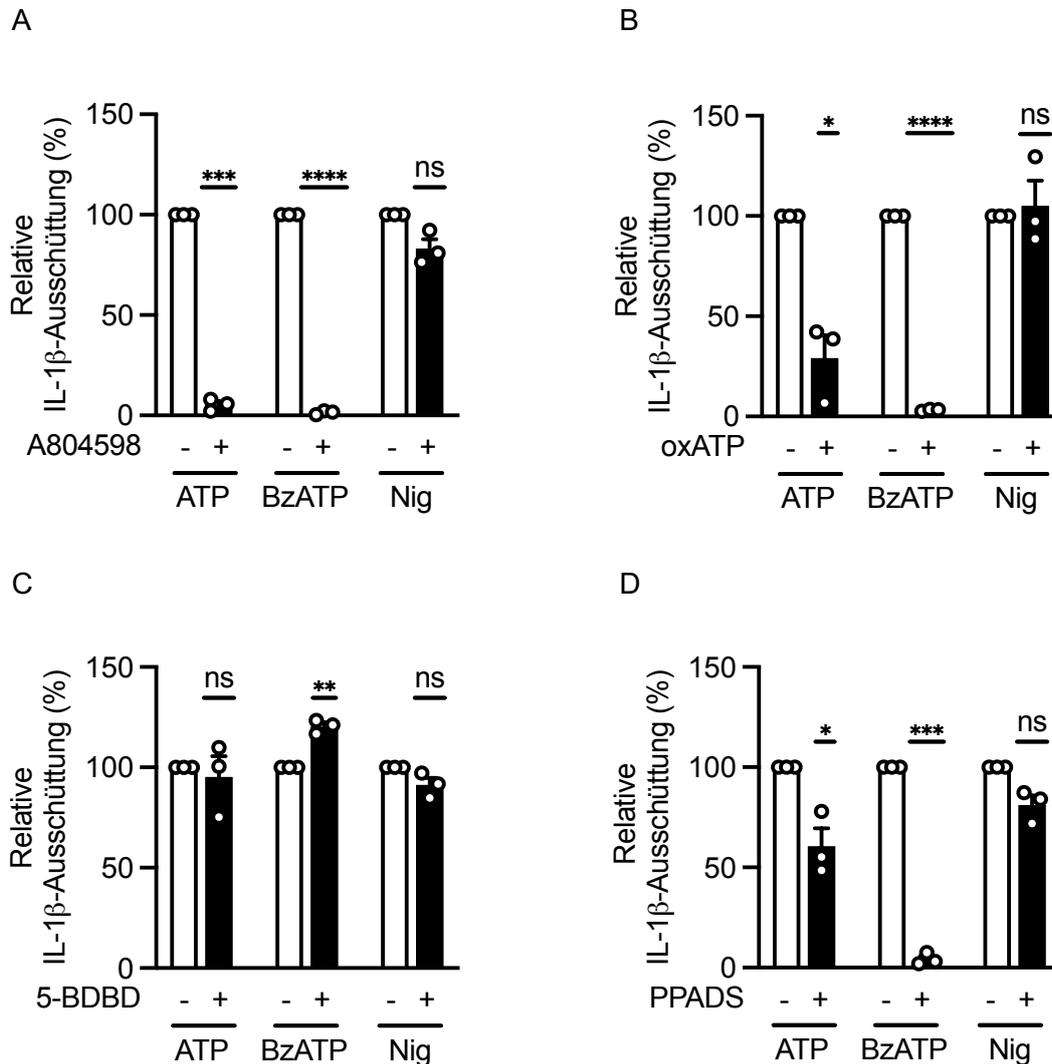


Abbildung 3.4: Die ATP- und BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist vom P2X7-Rezeptor abhängig. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit ATP (5 mM), BzATP (300 μ M) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. Antagonisten (A und B) des P2X7-Rezeptors (A804598, 1 μ M; oxATP, 300 μ M), (C) des P2X4-Rezeptors (5-BDBD, 25 μ M) oder (D) der P2-Rezeptoren (PPADS, 100 μ M) wurden eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch ATP-, BzATP- oder Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, Einstichproben-t-Test gegen 100 %. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

Bisher wird angenommen, dass ein K⁺-Efflux aus dem intrazellulären Raum für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms entscheidend ist (30,32), unabhängig davon, ob der P2X7-Rezeptor durch ATP oder BzATP aktiviert wird oder ob Nigericin als Ionophor verwendet wird. Um zu bestimmen, welches

die optimale extrazelluläre Kaliumchloridkonzentration ist, die zur Hemmung des K^+ -Ausstroms und der daraus resultierenden NLRP3-abhängigen IL-1 β -Sekretion erforderlich ist, wurde Nigericin zusammen mit steigende Kaliumkonzentrationen inkubiert (Abbildung 3.5 A). Eine Konzentration von 75 mM extrazellulärem Kaliumchlorid konnte die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung vollständig blockieren, ohne toxische Effekte zu verursachen (Abbildung 3.5 B). Die durch ATP- oder BzATP-vermittelte IL-1 β -Sekretion konnte durch 75 mM Kaliumchlorid hingegen nur um 50 % reduziert werden (Abbildung 3.5 C). Dies lässt vermuten, dass durch die Stimulation des P2X7-Rezeptors eine weitere Signalkaskade aktiviert wird, die unabhängig vom K^+ -Ausstrom und der damit verbundenen NLRP3-Inflammasom-Aktivierung eine IL-1 β -Freisetzung zur Folge hat.

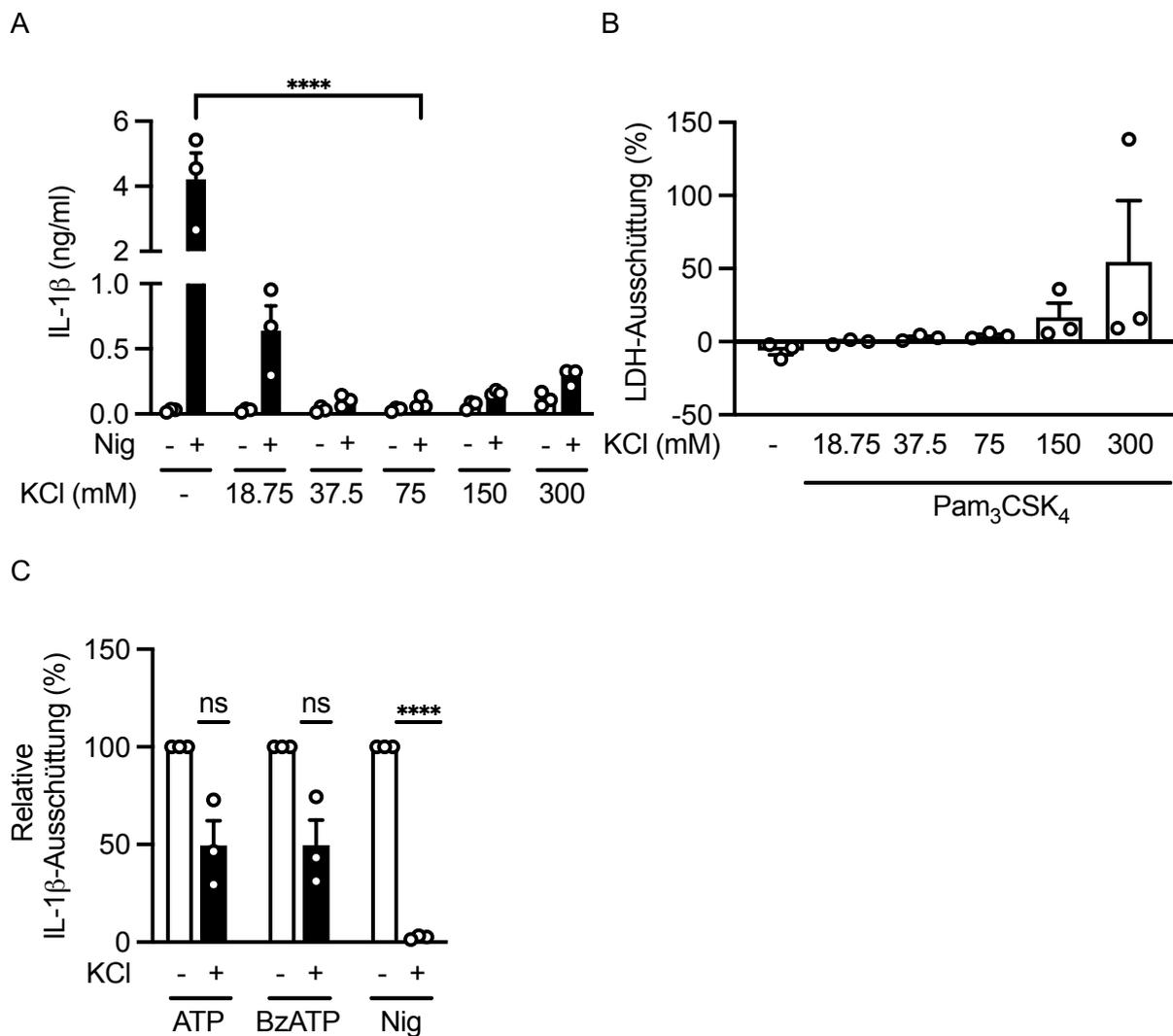


Abbildung 3.5: Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration inhibiert die Nigericin- und senkt die P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Freisetzung. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann in Ab- oder Anwesenheit von steigenden Kaliumchloridkonzentrationen 3 Stunden mit

Nigericin (10 μM) stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf die IL-1 β Konzentration oder (B) THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 $\mu\text{g/ml}$) *geprimt* und dann 3 Stunden mit steigenden Kaliumchloridkonzentrationen stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden auf die LDH-Freisetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in % der maximalen LDH-Freisetzung angegeben. (A und B) Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ****P \leq 0.0001, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Dunnett, (C) THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 $\mu\text{g/ml}$) *geprimt* und dann in Ab- oder Anwesenheit von 75 mM Kaliumchlorid 3 Stunden mit ATP (5 mM), BzATP (300 μM) oder Nigericin (10 μM) stimuliert. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch ATP-, BzATP- oder Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, ****P \leq 0.0001, Einstichproben-t-Test gegen 100 %. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

Darüber hinaus wurde die NLRP3-Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung genauer untersucht. In der Annahme, dass die IL-1 β -Freisetzung NLRP3-abhängig ist, wurden die NLRP3-Inflammasom-Inhibitoren Bay 11-7082 (255) und MCC950 (CRID3) (256) eingesetzt und die Veränderung der IL-1 β -Freisetzung gemessen. In Anwesenheit von Bay 11-7082 wurde die ATP-, BzATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung auf 50,5 %, 53,7 % bzw. 7,8 % reduziert (Abbildung 3.6 A). MCC950 senkte die ATP- und Nigericin-vermittelte IL-1 β -Sekretion auf 24,4 % bzw. 0,9 % (Abbildung 3.6 B). Interessanterweise wurde die durch BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch MCC950 nicht beeinflusst, was eine NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung durch P2X7-Rezeptoraktivierung vermuten lässt. Deswegen wurde im nächsten Schritt untersucht, ob THP-1 Zellen mit einem NLRP3-Knockout in der Lage sind IL-1 β freizusetzen. In der Tat führte eine Stimulation *geprimter* Knockout-Makrophagen mit BzATP oder ATP zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung, wobei die IL-1 β -Freisetzung durch BzATP sogar höher war als durch ATP. Im Gegensatz dazu konnte Nigericin die IL-1 β -Freisetzung in *geprimten* NLRP3-Knockout-THP-1 Makrophagen nicht erhöhen (Abbildung 3.6 C).

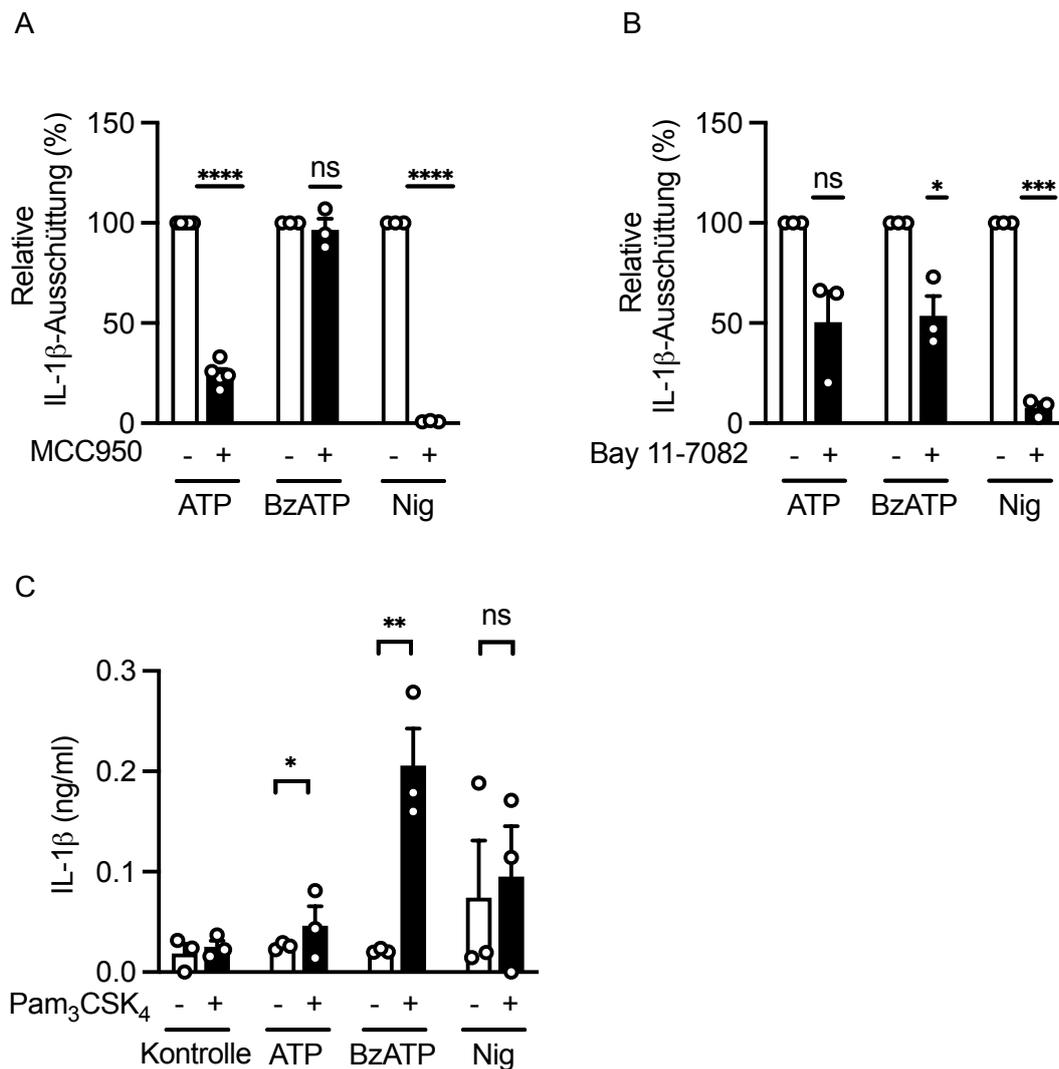


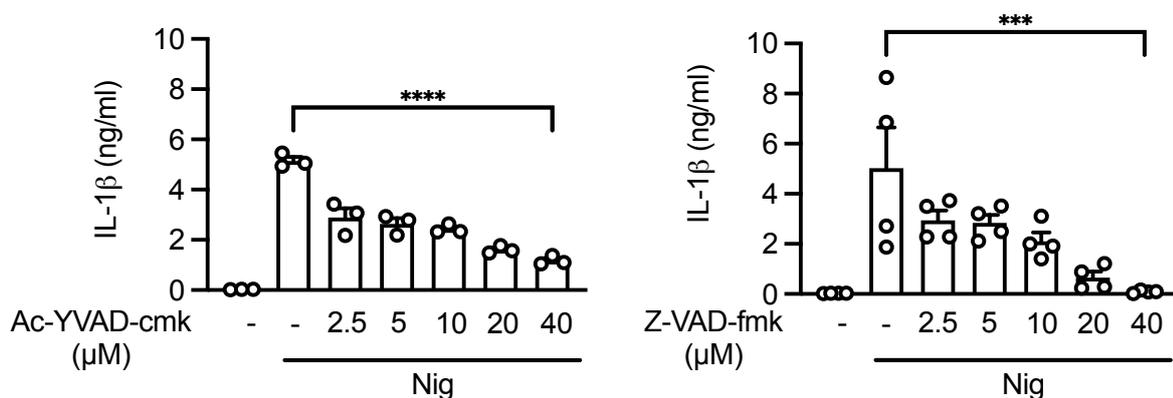
Abbildung 3.6: Die P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist NLRP3-unabhängig. (A und B) THP-1 Makrophagen wurden ohne oder mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit ATP (5 mM), BzATP (300 μ M) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. NLRP3-Inhibitoren (A) Bay-11.7082 (20 μ M) und (B) MCC950 (10 μ M) wurden eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch ATP-, BzATP- oder Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, Einstichproben-t-Test gegen 100 %. (C) NLRP3 KO THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit ATP (5 mM), BzATP (300 μ M) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. Die IL-1 β -Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA analysiert. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ungepaarter t-Test. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

3.1.3 Die durch den P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Sekretion ist teilweise Caspase-unabhängig

Die NLRP3-Oligomerisierung führt zur Selbstspaltung der Pro-Caspase-1 in ihre aktive Form (257). Anschließend spaltet die aktive Caspase-1 Pro-IL-1 β in reifes, bioaktives IL-1 β . Um festzustellen, inwieweit die IL-1 β -Sekretion von Caspasen abhängt, wurde der Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD-cmk und der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk verwendet. Zunächst wurde die optimale Konzentration ermittelt, die benötigt wird, um eine Hemmung der IL-1 β -Freisetzung zu erzielen. Dafür wurde der Stimulation von *geprimten* Makrophagen mit Nigericin steigende Konzentrationen des Caspase-1 und Pan-Caspase-Inhibitors zugesetzt (Abbildung 3.7 A). Eine Konzentration von 40 μ M erwies sich sowohl bei dem Caspase-1-Inhibitor als auch dem Pan-Caspase-Inhibitor als effektiv, ohne dabei toxische Effekte zu verursachen (Abbildung 3.7 B), weswegen diese Konzentration auch in den folgenden Experimenten eingesetzt wurde.

Durch die Hemmung der Caspase-1-Aktivität konnte die ATP-, BzATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Sekretion auf 64,8 %, 58,4 % bzw. 30,3 % reduziert werden (Abbildung 3.7 C). Die Wirkung des Pan-Caspase-Inhibitors Z-VAD-fmk auf die ATP- und Nigericin-vermittelte IL-1 β -Freisetzung war sogar noch ausgeprägter. Z-VAD-fmk senkte die ATP- und Nigericin-induzierten Zytokinspiegel auf 22,6 % bzw. 1,6 % senkte. Daher kann schlussgefolgert werden, dass an der ATP- und Nigericin-induzierten IL-1 β -Freisetzung neben der Caspase-1 auch andere Caspasen beteiligt sind. Die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung hingegen wurde durch den Pan-Caspase-Inhibitor mit einer Reduktion auf 56,4 % auf vergleichbare Weise gesenkt wie durch den Caspase-1-Inhibitor.

A



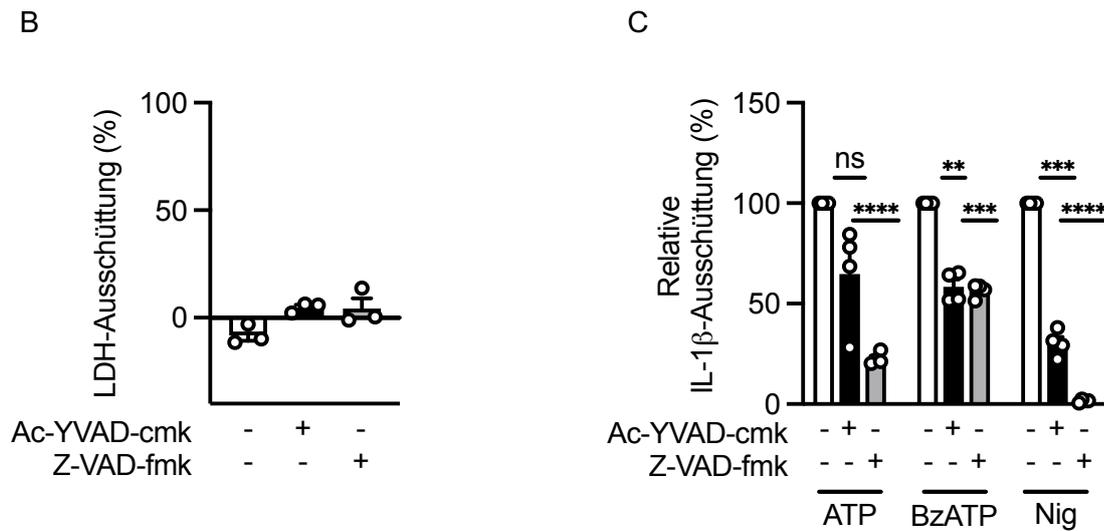


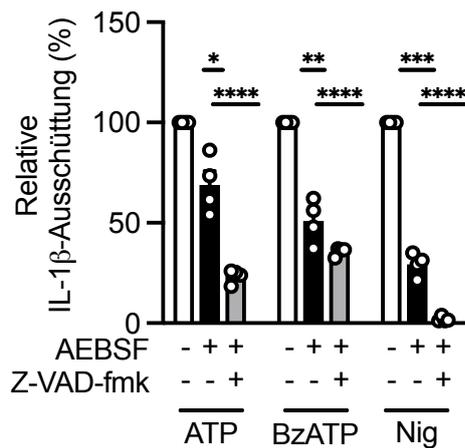
Abbildung 3.7: Der Einfluss von Caspasen auf die IL-1 β -Freisetzung. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden ohne oder mit Nigericin (10 μ M) stimuliert. Der Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD-cmk oder der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk wurde eine Stunde vor der Stimulation in steigenden Konzentrationen zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 4). Statistische Unterschiede: ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, einfaktorische Varianzanalyse gefolgt von Dunnett. (B und C) THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit ATP (5 mM), BzATP (300 μ M) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. Der Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD-cmk (40 μ M) oder der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk (40 μ M) wurde eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. (B) Die Zellkulturüberstände wurden auf die LDH-Freisetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in % der maximalen LDH-Freisetzung angegeben. (C) Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch ATP-, BzATP- oder Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, Einstichproben-t-Test gegen 100 %. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

3.1.3.1 Der Einfluss von Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen an der P2X7-vermittelten IL-1 β -Freisetzung

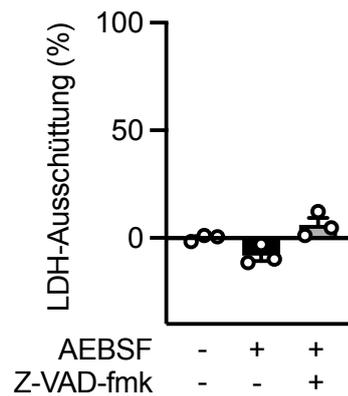
Da die ATP- und BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung durch Hemmung der Caspasen nicht vollständig blockiert werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Beteiligung anderer Proteasen an der IL-1 β -Sekretion untersucht. Dafür wurden Inhibitoren von Serin-, Cystein- und Aspartat-Proteasen verwendet. In Gegenwart des Serinprotease-Inhibitors AEBSF kam es zu einer Reduktion der IL-1 β -Sekretion, die durch ATP, BzATP und Nigericin vermittelt wurde (Abbildung 3.8 A). Wurde AEBSF in Kombination

mit einem Pan-Caspase-Inhibitor verwendet, konnte die IL-1 β -Sekretion, die durch ATP und BzATP vermittelt wurde, sogar weiter reduziert werden, während die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung vollständig blockiert wurde. In Gegenwart des Cysteinprotease-Inhibitors E64 oder des Aspartatprotease-Inhibitors Pepstatin A blieben die IL-1 β -Spiegel, die durch Stimulation von Makrophagen mit ATP, BzATP und Nigericin erreicht wurden, unverändert (Abbildung 3.8 C und E). Die Kombination von E64 oder Pepstatin A mit Z-VAD-fmk reduzierte jedoch die von ATP-, BzATP- und Nigericin-vermittelte IL-1 β -Freisetzung. Die eingesetzten Konzentrationen der Inhibitoren hatten dabei keine toxischen Effekte auf die THP-1 Zellen (Abbildung 3.8 B, D und F). Demnach verläuft sowohl die P2X7-Rezeptor-abhängige als auch die P2X7-Rezeptor-unabhängige IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen unter Beteiligung von Serinproteasen und Caspasen, wohingegen Cystein- und Aspartatproteasen nicht beteiligt sind.

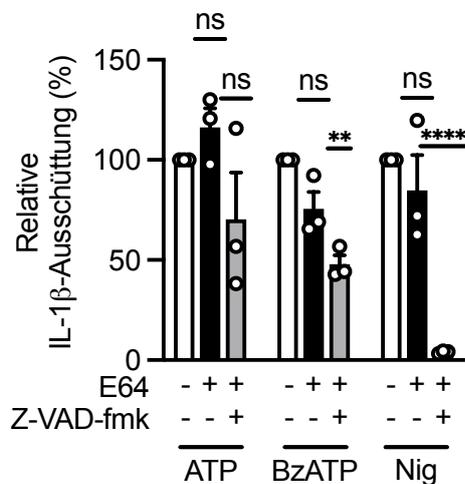
A



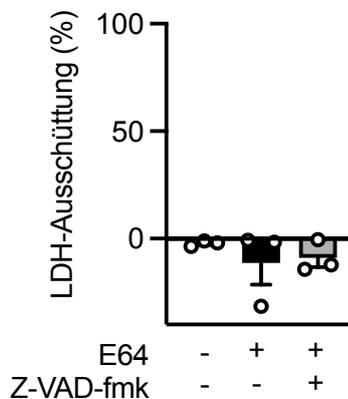
B



C



D



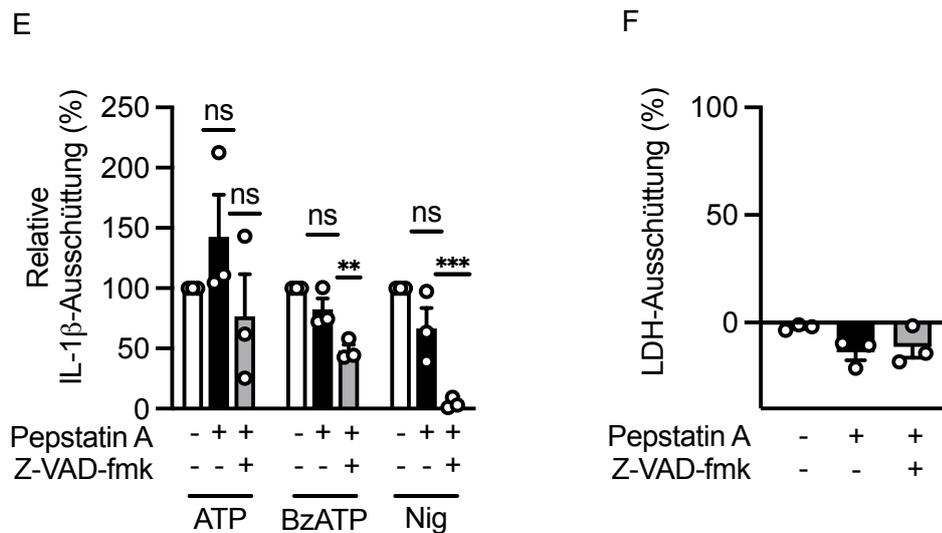


Abbildung 3.8: Der Einfluss verschiedener Proteasen auf die IL-1 β -Freisetzung. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit ATP (5 mM), BzATP (300 μ M) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. Inhibitoren der (A, B) Serinprotease (AEBSF, 300 μ M), (C, D) Cysteinprotease (E64, 10 μ M) (E, F) oder Aspartatprotease (Pepstatin A, 50 μ M) wurden mit oder ohne dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk (40 μ M) eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. (A, C, E) Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch ATP-, BzATP- oder Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. (B, D, F) Die Zellkulturüberstände wurden auf die LDH-Freisetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in % der maximalen LDH-Freisetzung angegeben. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, Einstichproben-t-Test gegen 100 %. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

3.1.3.2 Zusammenhang des K⁺-Effluxes und der Serinproteasen mit der Caspase-abhängigen IL-1 β -Freisetzung

Da die P2X7-vermittelte IL-1 β -Freisetzung durch Hemmung des K⁺-Efflux lediglich auf 50 % reduziert werden konnte, wurde die Existenz einer weiteren durch den P2X7-Rezeptor aktivierte Signalkaskade vermutet, die unabhängig vom K⁺-Ausstrom eine IL-1 β -Freisetzung zur Folge hat. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Caspase-abhängige IL-1 β -Freisetzung durch BzATP mit dem K⁺-Efflux zusammenhängt oder diese Signalkaskaden getrennt voneinander ablaufen. Dafür wurde der Einfluss der alleinigen oder gemeinsamen Hemmung des K⁺-Efflux und der Caspasen auf die IL-1 β -Freisetzung untersucht. Hierbei konnte ein synergistischer Effekt ausgeschlossen werden, da die Kombination von Kaliumchlorid und dem Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung auf ähnliche Werte reduzierte wie die Zugabe von Kaliumchlorid allein (Abbildung 3.9 A). In gleicher Weise verlief es auch mit dem Serinprotease-Inhibitor AEBSF (Abbildung 3.9 B). Eine Kombination

von AEBSF und Z-VAD-fmk konnte die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung nicht weiter reduzieren als AEBSF allein.

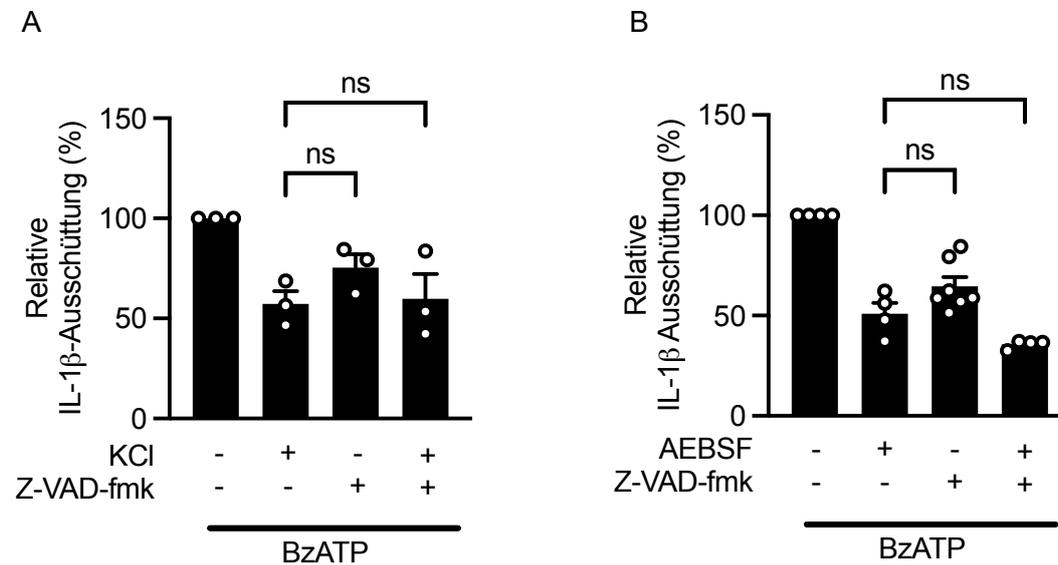


Abbildung 3.9: Die gleichzeitige Hemmung sowohl des K⁺-Effluxes als auch der Serinproteasen zusammen mit Caspasen zeigen keine additiven Effekte auf die IL-1 β -Freisetzung. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann (A) in An- oder Abwesenheit von Kaliumchlorid (75 mM) 3 Stunden mit BzATP (300 μ M) stimuliert. (A und B) Der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk (40 μ M) oder der (B) Serinprotease-Inhibitor (AEBSF, 300 μ M) wurden eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 7). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Tukey. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

Pro-IL-1 β kann statt durch Caspase-1 auch durch Serinproteasen in seine aktive Form gespalten werden (258). Nachdem bereits die Beteiligung von Serinproteasen auf die ATP-, BzATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung nachgewiesen wurde (Abbildung 3.8 A), wurde untersucht, ob eine Stimulation von Makrophagen mit ATP, BzATP oder Nigericin die Genexpression der Serinproteasen Proteinase 3 (*PRTN3*), neutrophile Elastase (*ELANE*) oder Cathepsin G (*CTSG*) beeinflusst. Es konnte jedoch keine Hochregulation der Gene *PRTN3*, *ELANE* oder *CTSG* gezeigt werden (Abbildung 3.10).

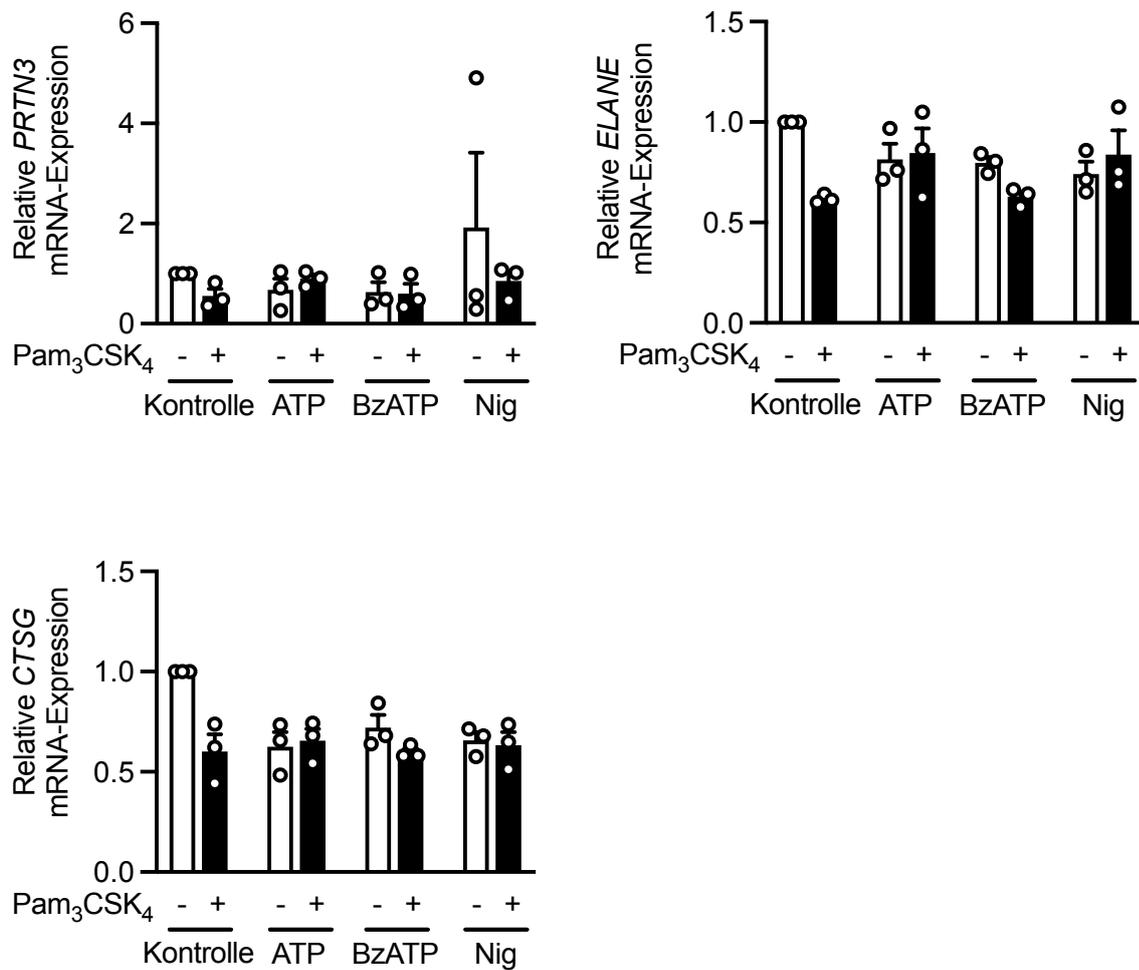


Abbildung 3.10: ATP, BzATP und Nigericin haben keinen Einfluss auf die Genexpression verschiedener Serinproteasen. THP-1 Makrophagen wurden ohne oder mit Pam₃CSK₄ (1 µg/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit ATP (5 mM), BzATP (300 µM) oder Nigericin (10 µM) stimuliert. Die Genexpression von *PRTN3*, *ELANE* und *CTSG* wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die jeweiligen Werte auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1.0). Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM (n = 3). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

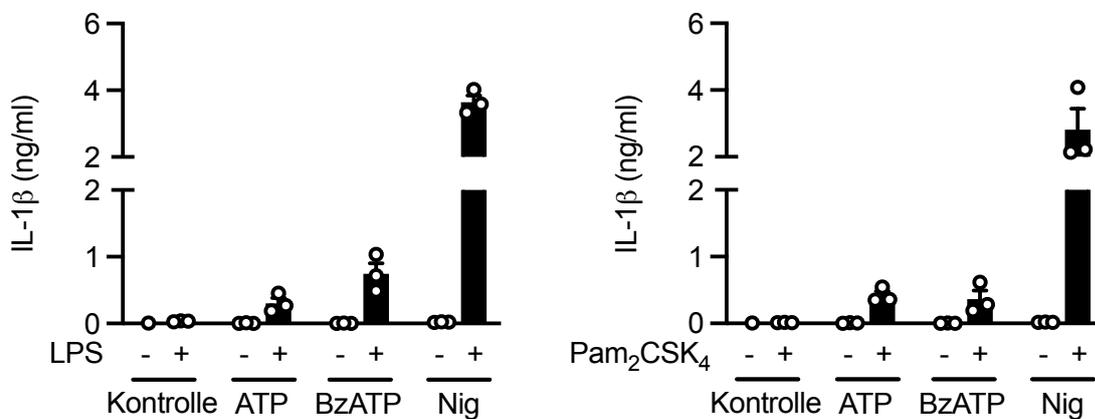
3.1.4 Priming mit verschiedenen TLR-Liganden beeinflusst die Signaltransduktion der P2X7-vermittelten IL-1β-Freisetzung

Wie bereits gezeigt wurde, ist ein TLR-vermitteltes *Priming* der THP-1 Makrophagen für eine Induktion der IL-1β-Freisetzung notwendig (Abbildung 3.3 A). Allerdings können nicht nur TLR2/1-Liganden als *Priming* dienen (259). Deswegen wurden auch der TLR2/6-Ligand Pam₂CSK₄ und der TLR4-Ligand LPS anstelle von Pam₃CSK₄ verwendet (Abbildung 3.11 A). Mit Pam₂CSK₄- und LPS-*geprimte* THP-1

Makrophagen führten nach Stimulation mit ATP, BzATP oder Nigericin zu einer gesteigerten Freisetzung von IL-1 β , die aber geringer ausfiel als in Pam₃CSK₄-geprimten Zellen.

Daraufhin wurde die Rolle des *Primings* durch verschiedene TLR-Signalwege weiter charakterisiert. Durch Aktivierung der TLR2- oder TLR4-Signalkaskade wurde die Genexpression von *IL1B* und *IL18* erhöht (Abbildung 3.11 B). Unterschiede abhängig von der TLR-Signalkaskade konnten jedoch nicht festgestellt werden, weswegen angenommen wurde, dass das *Priming* durch verschiedene TLR-Liganden keinen weiteren Einfluss auf die Induktion der NLRP3-abhängigen IL-1 β -Freisetzung hat. Die Hemmung des NLRP3-Inflammasoms in mit Nigericin-stimulierten Makrophagen führte zu einer vergleichbaren Abnahme der IL-1 β -Freisetzung, unabhängig davon, welcher TLR-Ligand für das *Priming* verwendet wurde (Abbildung 3.11 C). Wie zuvor bereits gezeigt wurde (Abbildung 3.6 B), blieben die durch BzATP-induzierten Zytokinspiegel in Anwesenheit des NLRP3-Inflammasom-Inhibitors MCC950 unverändert, wenn das *Priming* mit dem TLR2/1-Liganden Pam₃CSK₄ durchgeführt wurde. Im Gegensatz dazu wurde in mit LPS- und Pam₂CSK₄-geprimte Makrophagen die BzATP-induzierten IL-1 β -Zytokinspiegel durch die NLRP3-Inflammasom-Hemmung auf 44,6 % bzw. 57,0 % reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die TLR-Signalübertragung die Signaltransduktion der P2X7-vermittelten IL-1 β -Freisetzung unterschiedlich moduliert.

A



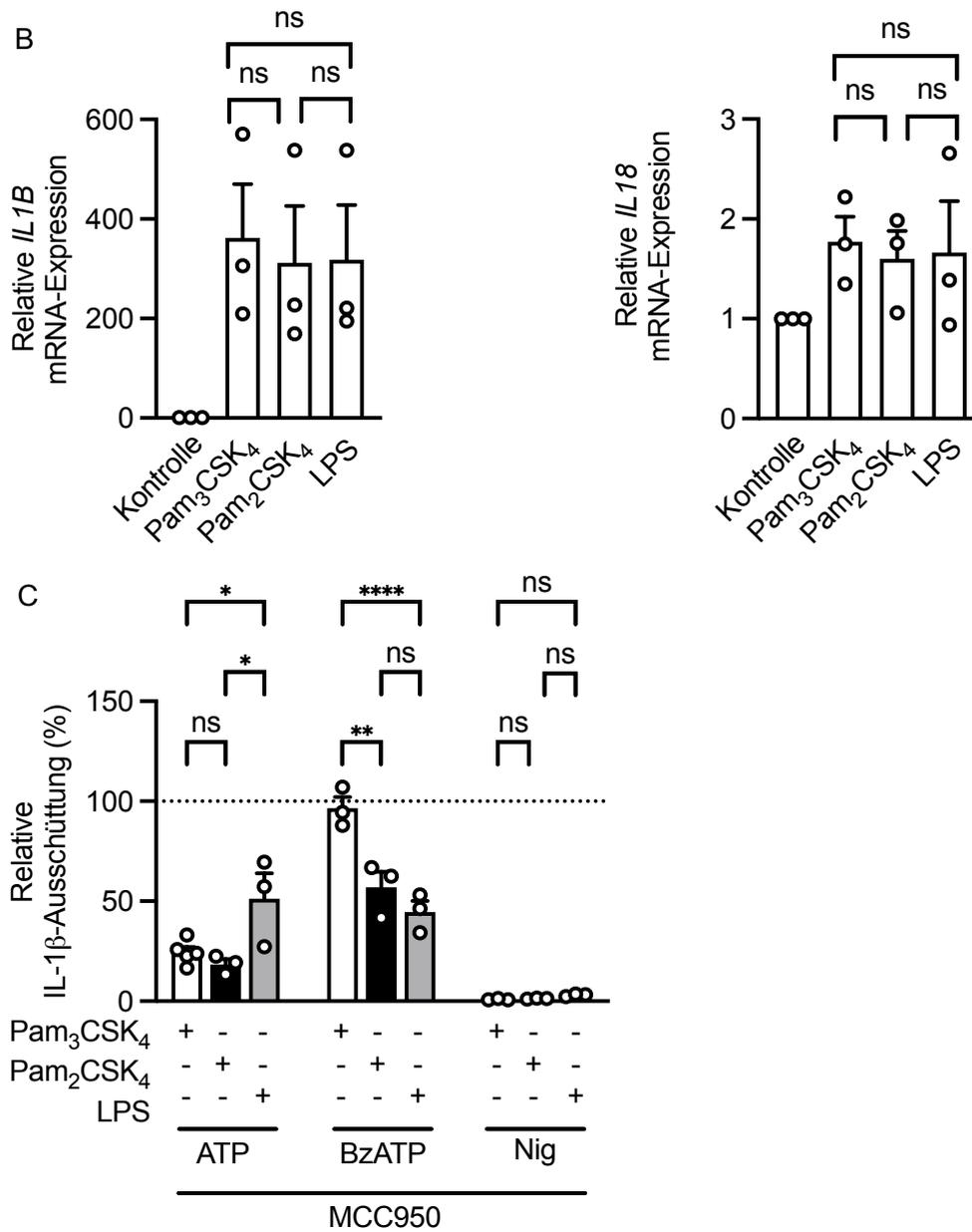


Abbildung 3.11: Der Einfluss des Primings durch verschiedene TLR-Liganden auf die IL-1β-Freisetzung. THP-1 Makrophagen wurden ohne, mit Pam₂CSK₄ oder mit LPS (je 1 µg/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden ohne oder mit ATP (5 mM), BzATP (300 µM) oder Nigericin (10 µM) stimuliert. Die IL-1β-Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). (B) THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄, Pam₂CSK₄ oder LPS (je 1 µg/ml) *geprimt*. Die Genexpression von *IL1B* und *IL18* wurden auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1.0). Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns ≥ 0.05, einfaktorische Varianzanalyse gefolgt von Tukey. (C) THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄, Pam₂CSK₄ oder LPS (je 1 µg/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit ATP (5 mM), BzATP (300 µM) oder Nigericin (10 µM)

stimuliert. Der NLRP3-Inhibitor MCC950 (10 μ M) wurde eine Stunde vor Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch ATP-, BzATP- oder Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 5). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, einfaktorische Varianzanalyse gefolgt von Tukey. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

Obleich die IL-1 β -Freisetzung durch Stimulation des P2X7-Rezeptoragonisten BzATP in Pam₃CSK₄, Pam₂CSK₄ oder LPS *geprimten* Zellen ähnlich hoch ausfiel (Abbildungen 3.3 A und 3.11 A), sollte ausgeschlossen werden, dass sich eine Stimulation durch verschiedene TLRs auf die P2X7-Rezeptorexpression auswirkt, was die ATP oder BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung beeinflussen würde. Dafür wurden THP-1 Makrophagen ohne oder mit dem TLR2/1-Liganden Pam₃CSK₄, dem TLR2/6-Liganden Pam₂CSK₄ oder dem TLR4-Liganden LPS inkubiert und die relativen P2X7-Rezeptor-Proteinspiegel mittels Western Blot Analytik untersucht (Abbildung 3.12). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der P2X7-Rezeptor-Proteinspiegel im Vergleich zur Kontrolle, sodass eine TLR-vermittelte Beeinflussung der P2X7-Rezeptorexpression ausgeschlossen werden konnte.

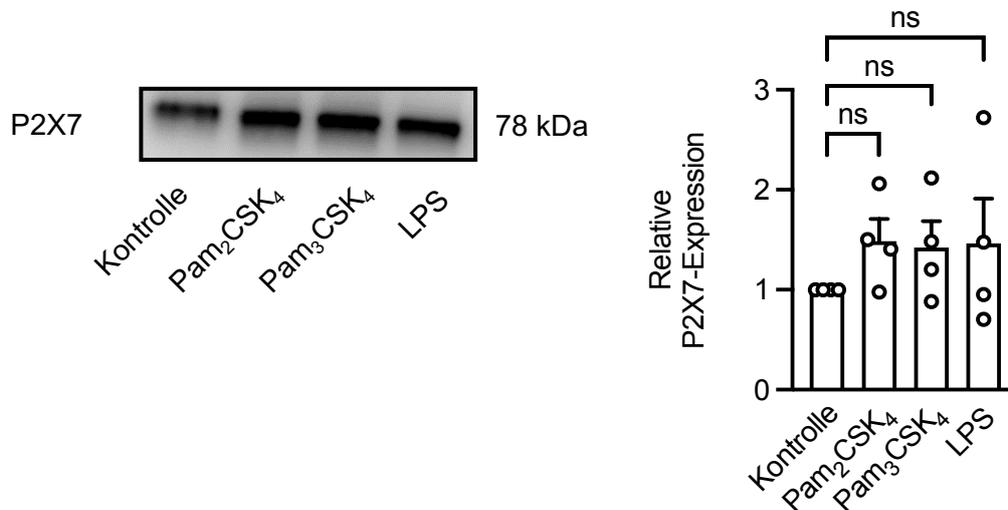


Abbildung 3.12: Der Einfluss verschiedener TLR-Liganden auf die P2X7-Rezeptorexpression. THP-1 Makrophagen wurden 24 Stunden ohne oder mit Pam₃CSK₄, Pam₂CSK₄ oder LPS (je 1 μ g/ml) inkubiert. Die Proteinlevel des P2X7-Rezeptors aus den Zelllysaten wurden mittels Western Blot Analytik bestimmt. Die Daten repräsentieren 4 unabhängige Experimente. Die P2X7-Rezeptor-Proteinlevel wurden auf die jeweilige Gesamtproteinmenge normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die jeweilige Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM, (n = 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, einfaktorische Varianzanalyse gefolgt von Tukey.

3.2 Auswirkungen von Ap4 auf Zellen des angeborenen Immunsystems

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATP über P2X7-Rezeptoren einen Einfluss auf die IL-1 β -Freisetzung in Immunzellen hat. Ap4, welches sich strukturell nur durch eine weitere Phosphatgruppe von ATP unterscheidet, könnte demnach eine ähnliche Wirkung aufweisen. Da immunmodulatorische Wirkungen von Ap4 bisher nicht in der Literatur beschrieben sind, sollten die Effekte von Ap4 auf Monozyten und Makrophagen in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass Ap4 aus dem Endothel stammt und über die Bindung am P2X1-Rezeptor als starker Vasokonstriktor fungiert (97). Im folgenden Teil wird untersucht, ob Ap4 auch an anderen P2X-Rezeptoren wie dem P2X7-Rezeptor wirken kann und dadurch eine Freisetzung von IL-1 β induziert.

3.2.1 Ap4 induziert in angeborenen Immunzellen die Freisetzung von IL-1 β

Zuerst wurde überprüft, ob Ap4 zu einer Freisetzung von IL-1 β führt. Dafür wurden PBMCs mit dem TLR2/1-Agonisten Pam₃CSK₄ *geprimt* und anschließend mit Ap4 stimuliert. In *geprimten* PBMCs vermittelte Ap4 die Freisetzung von IL-1 β . Ein *Priming* mit Pam₃CSK₄ war dafür notwendig (Abbildung 3.13). Auffällig war, dass die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung schwächer ausgeprägt war als die IL-1 β -Freisetzung durch äquimolare Konzentrationen von ATP (Abbildung 3.1).

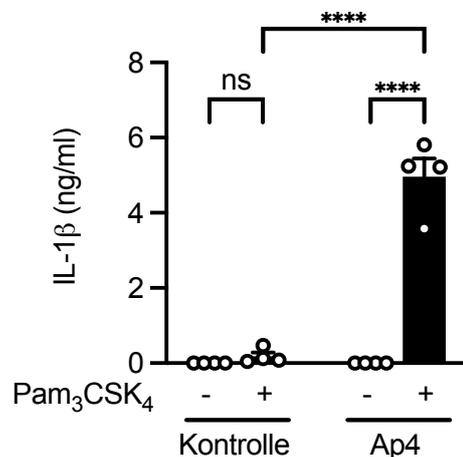


Abbildung 3.13: Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in *geprimten* PBMCs. (A) PBMCs wurden ohne oder mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap4 (5 mM) stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden mittels ELISA auf die IL-1 β Konzentration untersucht. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0,05, *P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001, ****P \leq 0,0001, (A) einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Dunnett.

Als nächstes wurde getestet, ob Ap4 neben IL-1 β auch eine Freisetzung anderer Zytokine begünstigt. Deshalb wurden die Zellkulturüberstände von Ap4-stimulierten PBMCs mittels Multiplex-Analyse auf verschiedene Zytokine untersucht. Es sollten dabei die Effekte von Ap4 allein, aber auch der Effekt von Ap4 auf mit Pam₃CSK₄ *geprimte* Zellen untersucht werden. Es konnte keine Freisetzung von IL-17A, GM-CSF, IFN- α , IL-4 oder IL-5 nachgewiesen werden. Darüber hinaus war die Freisetzung von IL-2, IL-12, IL-9, IL-10, IFN- γ nach Stimulation mit Ap4 gegenüber der unstimulierten Kontrolle nicht erhöht. Wie erwartet induzierte Pam₃CSK₄ die Freisetzung von TNF und IL-6, aber auch hier blieben die Zytokinspiegel unverändert, wenn die Zellen anschließend mit Ap4 stimuliert wurden (Abbildung 3.14).

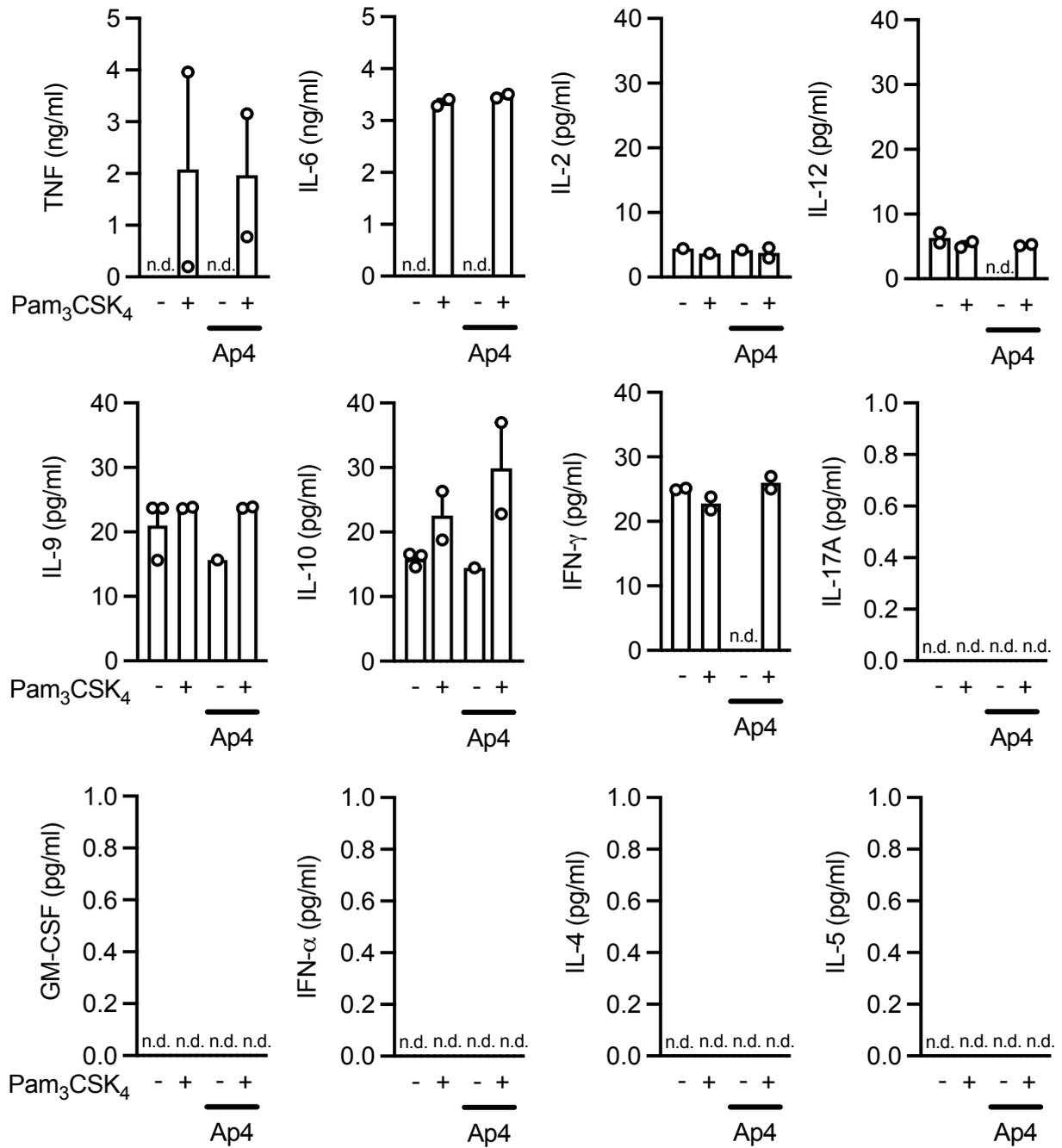


Abbildung 3.14: Beeinflussung der Zytokinfreisetzung durch Ap4-Stimulation von PBMCs. PBMCs wurden ohne oder mit Pam₃CSK₄ (1 µg/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit oder ohne Ap4 (5 mM) stimuliert. Die Zytokinkonzentrationen der Zellkulturüberstände wurde mit dem MACSPlex Multiplex Assay mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 2 - 3).

Wie bereits bestätigt werden konnte, eignet sich die humane THP-1 Zelllinie als Modell für die Untersuchung der ATP-vermittelten NLRP3-Inflammasom-Aktivierung und IL-1 β -Freisetzung. Ap4 induzierte in *geprimten* nicht aber in *ungeprimten* THP-1 Monozyten einen signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung, auch wenn die Antwort geringer ausfiel als in PBMCs (Abbildung 3.15).

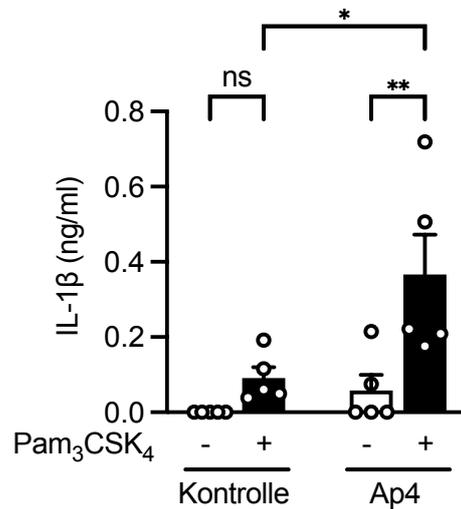


Abbildung 3.15: Ap4 induziert die Freisetzung von IL-1 β in *geprimten* THP-1 Monozyten. THP-1 Monozyten wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 6 Stunden mit Ap4 (5 mM) stimuliert. (A) Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM, (n = 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, einfaktorische Varianzanalyse gefolgt von Dunnett.

In *geprimten* THP-1-Makrophagen erhöhte Ap4 die IL-1 β -Sekretion konzentrationsabhängig (Abbildung 3.16 A). Wie in PBMCs war ein *Priming* mit einem TLR2/1-Liganden dafür notwendig. Die Bioaktivität des sezernierten IL-1 β wurde anschließend überprüft, indem die Zellkulturüberstände stimulierter THP-1 Zellen mit HEK293 Reporterzellen analysiert wurden. In der Tat konnte gezeigt werden, dass im Zuge der Ap4-Stimulation bioaktives IL-1 β ausgeschüttet wird (Abbildung 3.16 B). In einem nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch Caspase-1-Aktivität und damit einhergehende Pyroptose freigesetzt wird. Ap4 führte in THP-1 Makrophagen zu einem Anstieg der LDH-Konzentration. Allerdings war die LDH-Freisetzung nach Ap4-Stimulation bei *ungeprimten* Zellen ähnlich hoch wie bei *geprimten* Zellen (Abbildung 3.16 C). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Ap4 selbst zytotoxische Effekte hat, die unabhängig von der Caspase-1-abhängigen Pyroptose zu einer Membranpermeabilität führen.

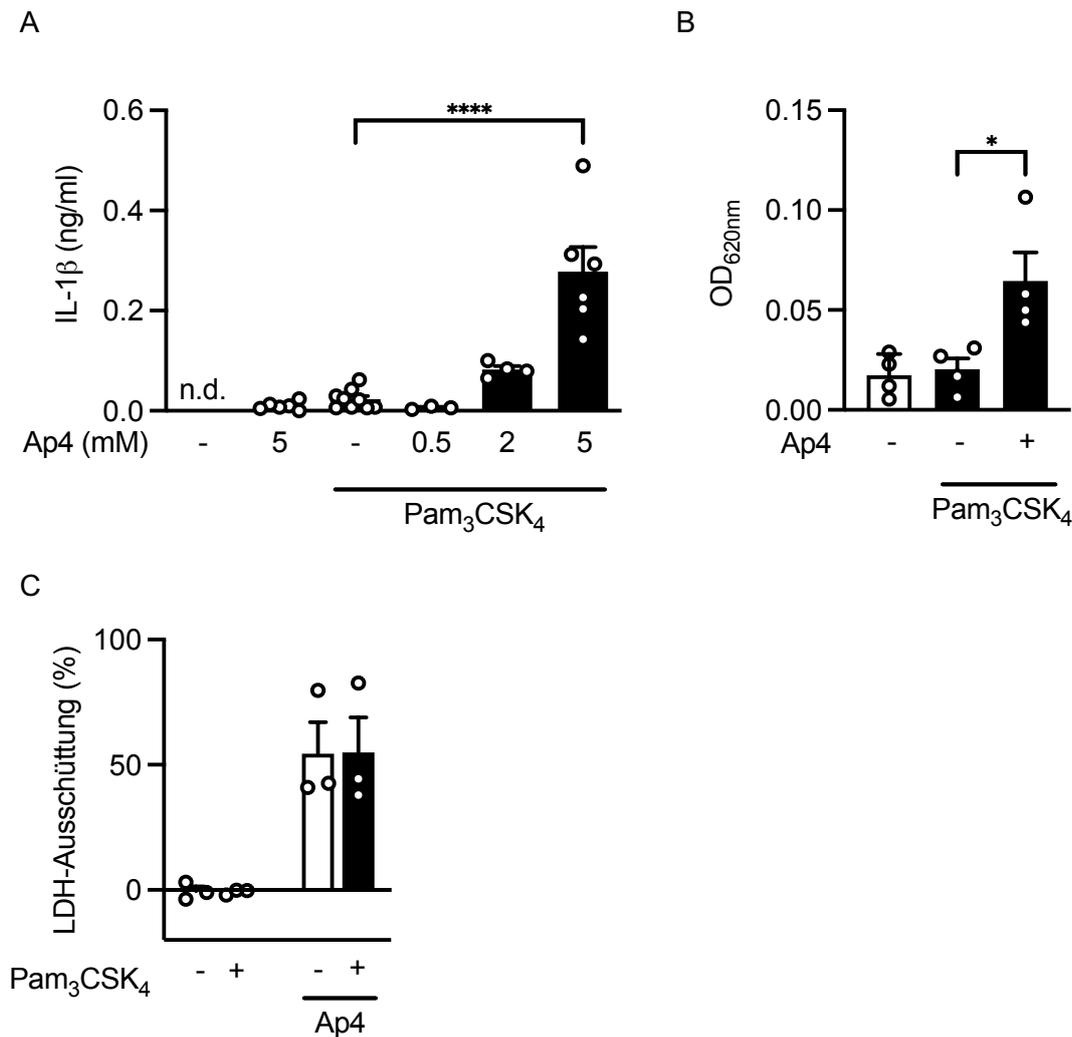


Abbildung 3.16: Ap4 induziert konzentrationsabhängig die Freisetzung von bioaktivem IL-1 β in geprimten THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit (A) steigenden Konzentrationen von Ap4 oder (B und C) 5 mM Ap4 stimuliert. (A) Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 6). Statistische Unterschiede: ****P \leq 0.0001, einfaktorielles Varianzanalyse gefolgt von Tukey. (B) Die Zellkulturüberstände der stimulierten THP-1 Makrophagen wurden auf HEK293 Reporterzellen übertragen. Die SEAP-Produktion wurde mit QUANTI-Blue nachgewiesen und die optische Dichte bei 620 nm gemessen. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, einfaktorielles Varianzanalyse gefolgt von Dunnett. (C) Die Zellkulturüberstände wurden auf die LDH-Freisetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in % der maximalen LDH-Freisetzung angegeben. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM, (n = 3).

Um zu untersuchen, ob Ap4 in THP-1 Makrophagen neben IL-1 β zur Freisetzung von anderen proinflammatorischen Zytokinen führt, wurde die IL-8- und TNF-Freisetzung mittels ELISA untersucht.

Im Einklang mit den Ergebnissen, die mit PBMCs erzielt wurden, wurde durch Ap4 kein Anstieg der Konzentrationen von IL-8 oder TNF beobachtet, während Pam₃CSK₄ wie erwartet die Sekretion beider Zytokine stark erhöhte (Abbildung 3.17 A und B).

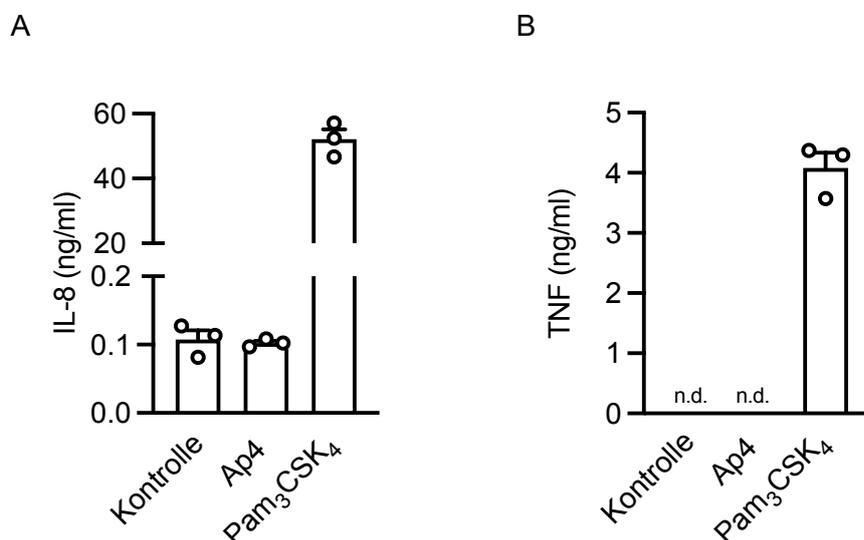


Abbildung 3.17: Einfluss der Stimulation von THP-1 Makrophagen mit Ap4 auf die IL-8- und TNF-Freisetzung. THP-1 Makrophagen wurden (A) 24 h oder (B) 4 h mit Ap4 (5 mM) oder Pam₃CSK₄ (1 µg/ml) stimuliert. Die (A) IL-8- und (B) TNF-Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3).

3.2.2 Einfluss von P2X-Rezeptoren auf die Ap4-induzierte IL-1β-Freisetzung

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu ATP, wurde die Hypothese aufgestellt, dass Ap4 die IL-1β-Freisetzung ebenfalls über den P2X7-Rezeptor vermittelt. Außerdem wird, wie bereits erwähnt, auch der P2X4-Rezeptor mit der IL-1β-Freisetzung in Verbindung gebracht. Um die Abhängigkeit der Ap4-induzierten IL-1β-Freisetzung von P2X7- und P2X4-Rezeptoren zu überprüfen, wurde der Einfluss verschiedener P2X-Rezeptorantagonisten vor der Ap4-Stimulation getestet. Während die Ap4-induzierte IL-1β-Freisetzung durch die Zugabe des nicht-kompetitiven reversiblen P2X7-Rezeptorantagonisten A804598 unverändert blieb (Abbildung 3.18 A), wurde die IL-1β-Freisetzung durch ATP durch A804598 komplett verhindert (Abbildung 3.4 A). In Anwesenheit des irreversiblen P2X7-Rezeptorantagonisten oxATP wurde die Ap4-induzierte IL-1β-Freisetzung jedoch auf 42,7 % gesenkt (Abbildung 3.18 B), was sich mit Ergebnissen für ATP deckt (Abbildung 3.4 B). In Anwesenheit des P2X4-Rezeptorantagonisten 5-BDBD verringerte sich die Ap4-induzierte IL-1β-Freisetzung nicht (Abbildung 3.18 C) und auch durch die Zugabe von PPADS, ein P2-Rezeptorantagonist, blieb die IL-1β-Freisetzung unverändert (Abbildung 3.18 D). Obwohl der P2X7-Rezeptor an der Wirkung von Ap4

beteiligt zu sein scheint, konnte die IL-1 β -Freisetzung von Ap4-stimulierten Makrophagen durch keinen der getesteten P2X-Rezeptorantagonisten komplett verhindert werden.

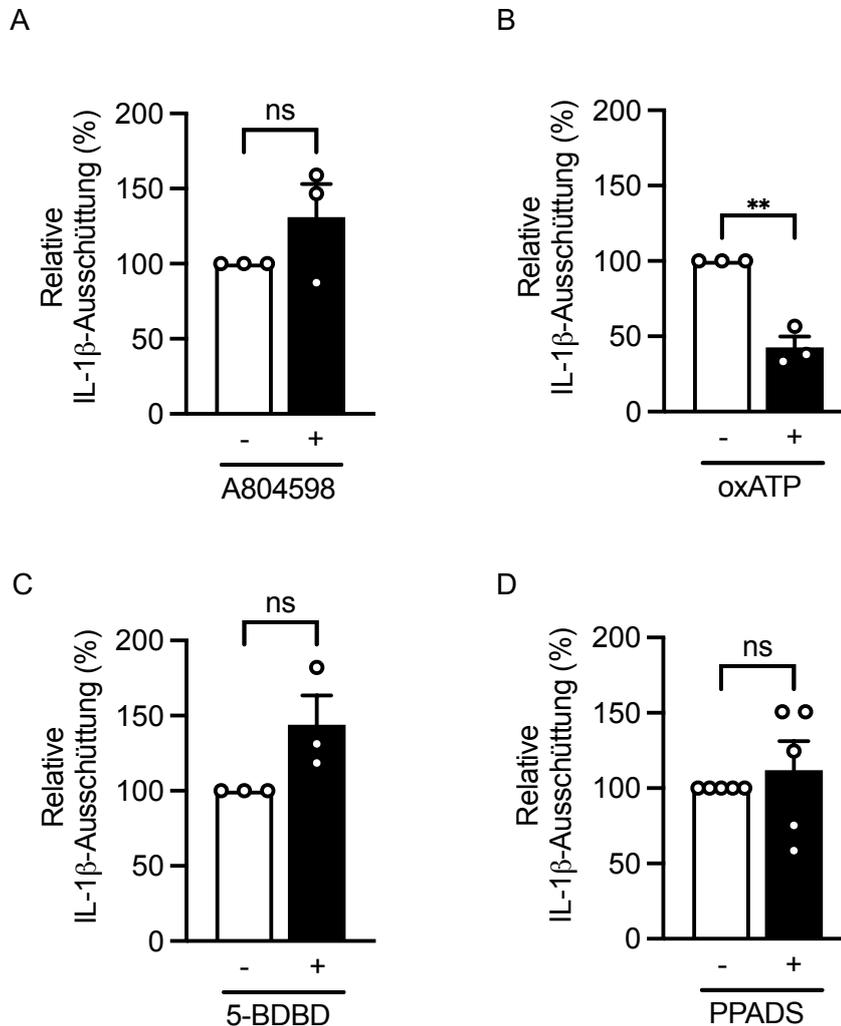


Abbildung 3.18: Einfluss verschiedener P2X-Rezeptoren auf die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap4 (5 mM) stimuliert. Antagonisten (A und B) des P2X7-Rezeptors (A804598, 1 μ M; oxATP, 300 μ M), (C) des P2X4-Rezeptors (5-BDBD, 25 μ M) oder (D) der P2-Rezeptoren (PPADS, 100 μ M) wurden eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 5). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, **P \leq 0.01, Einstichproben-t-Test gegen 100 %.

3.2.3 Einfluss von Ap4 auf Purinrezeptoren

Extrazelluläres ATP und Ap4 stimulieren den zytosolischen Calciumeinstrom über verschiedene purinerge Rezeptoren (71,113,114). Daher wurde die Signalübertragung von ATP und Ap4 in Makrophagen unabhängig von der IL-1 β -Freisetzung verglichen. Um die direkte Wirkung von Ap4 am Rezeptor zu untersuchen, wurde getestet, ob niedrige Ap4-Konzentrationen einen Calciumeinstrom in Makrophagen auslösen. Dafür wurde Ap4 in verschiedenen Konzentrationen zu den mit dem Calciumindikator Fluo-4 AM beladenen THP-1 Makrophagen zugefügt und die Steigerung der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 90 Sekunden gemessen (Abbildung 3.19). Wie erwartet, induzierten 100 μ M der Referenzsubstanz ATP einen Kalziumeinstrom in THP-1-Makrophagen. Durch Ap4 konnte ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden, wobei eine Mindestkonzentration von 0,1 μ M Ap4 notwendig war, um den Calciumeinstrom sichtbar zu messen. In THP-1 Makrophagen war die Fluoreszenzintensität, die durch Zugabe von Ap4 induziert wurde, deutlich schwächer als die, die durch ATP vermittelt wurde.

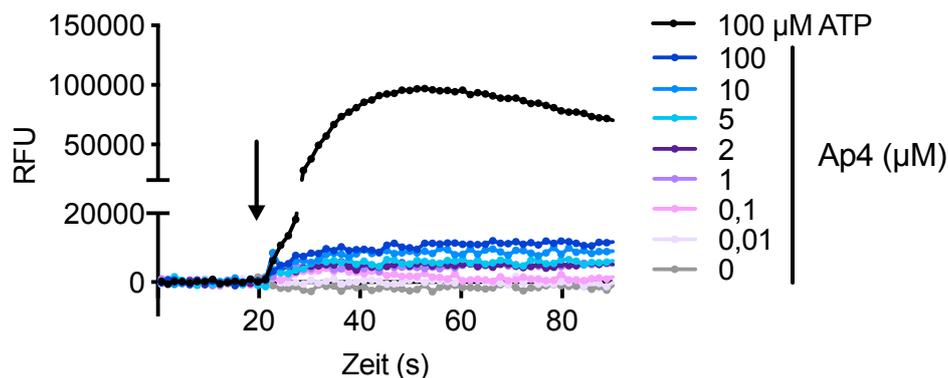


Abbildung 3.19: Ap4 induziert einen Calciumeinstrom in THP-1 Makrophagen. THP-1 Makrophagen wurden mit Fluo-4 AM und Probenecid beladen. Ap4 in Endkonzentrationen von 0,1 bis 100 μ M oder ATP 100 μ M wurde nach 20 Sekunden zugegeben. Der Calciumeinstrom wurde mittels Fluoreszenzintensitätsmessung bestimmt. Die Pfeile zeigen die Zugabe der Kontrolle oder der Stimuli. Der Graph zeigt die Mittelwerte bezogen auf das Basallevel ($n = 2$).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Stimulation mit ATP in THP-1 Monozyten zu einem stärkeren Calciumeinstrom führt als in THP-1 Makrophagen (260). Da Ap4 in den THP-1 Makrophagen nur einen sehr geringen Calciumeinstrom induzierte, wurde der Versuch mit THP-1 Monozyten wiederholt, um stärkere Effekte zu erzielen. Auch in THP-1 Monozyten kam es durch Ap4 zu einem konzentrationsabhängigen Calciumeinstrom, beginnend bei der Konzentration 1 μ M und einem EC50 Wert von 0,004 mM. (Abbildung 3.20). Im Vergleich zu den Ergebnissen in THP-1 Makrophagen, war

der Effekt von 100 μM Ap4 in THP-1 Monozyten mit 100 μM ATP vergleichbar. Die kinetische Betrachtung zeigt, dass der Calciumeinstrom in den THP-1 Monozyten anders verläuft als in den THP-1 Makrophagen. In THP-1-Makrophagen blieb das anfängliche Plateau während des Aufzeichnungszeitraums konstant (Abbildung 3.19), während in THP-1-Monozyten eine biphasische Calciumantwort beobachtet wurde. So wurde die maximale RFU nur wenige Sekunden nach der Zugabe von Ap4 erreicht. Anschließend ließ der Calciumeinstrom nach und näherte sich bei der Verwendung von niedrigen Konzentrationen von 0,01 bis 5 μM wieder dem Ausgangswert an. Wurde Ap4 mit 10 oder 100 μM verwendet, stieg der Calciumeinstrom nach einer kurzen Abklingphase erneut an und erreichte einen zweiten Peak, bevor sich die Fluoreszenzintensität dem Ausgangszustand näherte.

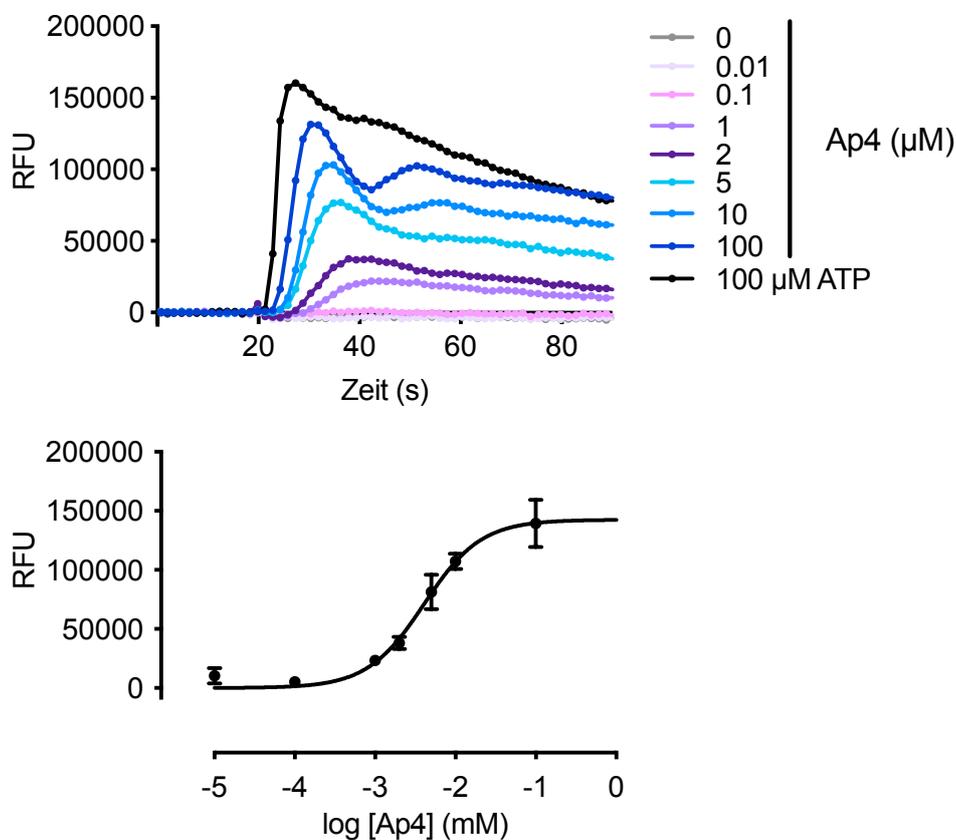


Abbildung 3.20: Ap4-induziert einen Calciumeinstrom in THP-1 Monozyten. THP-1 Monozyten wurden mit Fluo-4 AM und Probenecid beladen. Ap4 in Endkonzentrationen von 0,1 bis 100 μM oder ATP 100 μM wurde nach 20 Sekunden zugegeben. Der Calciumeinstrom wurde mittels Fluoreszenzintensitätsmessung bestimmt. Der Pfeil zeigt die Zugabe der Kontrolle oder der Stimuli. Der Graph zeigt die Mittelwerte bezogen auf das Basallevel ($n = 3 - 5$). Mit den Werten zum Zeitpunkt der maximalen RFU wurde eine Konzentrations-Wirkungskurve erstellt. Der Graph zeigt die Mittelwerte + SEM ($n = 3 - 5$).

Um festzustellen, welche Rezeptortypen am Ap4-induzierten Calciumeinstrom beteiligt sind, wurde untersucht, ob die Zugabe des P2-Rezeptorantagonisten PPADS oder des Gq/11-Inhibitors YM-254890 (261) einen Einfluss auf die Fluoreszenzintensitätssteigerung durch Ap4 hat. YM-254890 hemmt auch P2Y-Rezeptoren, die an G_{q/11} koppeln, wie beispielsweise P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6. In Gegenwart von PPADS wurde ein leichter, aber nicht signifikanter Rückgang des Calciumeinstroms beobachtet, während YM-254890 den Ap4-vermittelten Calciumeinstrom in THP-1-Monozyten vollständig hemmte (Abbildung 3.21 A und B). Dies deutet darauf hin, dass Ap4 den Calciumeinstrom in THP-1-Monozyten hauptsächlich über P2Y-Rezeptoren vermittelt, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass andere GPCRs, die an G_{q/11} koppeln, ebenfalls zu diesem Effekt beitragen.

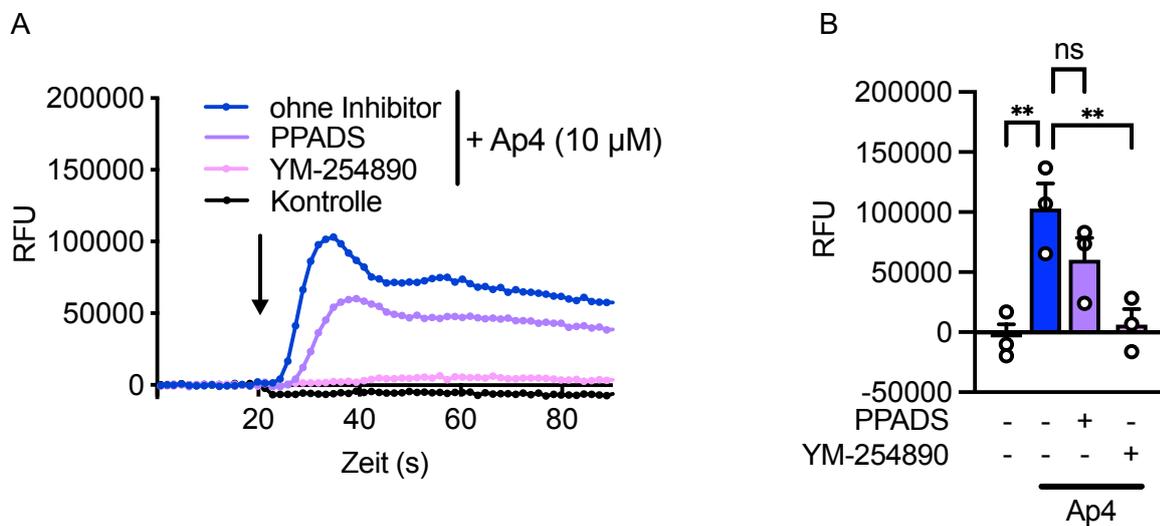


Abbildung 3.21: Der Ap4-induzierte Calciumeinstrom wird hauptsächlich durch G_q-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. (A und B) THP-1 Monozyten wurden mit Fluo-4 AM und Probenecid beladen. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem P2-Rezeptorantagonisten PPADS (100 µM) oder dem G_q-Inhibitor YM-254890 (1 µM) vorinkubiert. Ap4 in Endkonzentrationen von 10 µM wurde nach 20 Sekunden zugegeben. Der Calciumeinstrom wurde mittels Fluoreszenzintensitätsmessung bestimmt. (A) Der Graph zeigt die Mittelwerte bezogen auf das Basallevel (n = 3). Der Pfeil zeigt die Zugabe der Kontrolle oder der Stimuli. (B) Unter Verwendung der jeweiligen maximalen RFU-Werte jeder Probe wurde ein Balkendiagramm erstellt. Mittelwert + SEM, (n = 3). Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 4). Statistische Unterschiede: ns ≥ 0.05, **P ≤ 0.01, einfaktorische Varianzanalyse gefolgt von Dunnett.

3.2.4 Effekte von Ap4 am P2X7-Rezeptor

Die Aktivierung von P2X7-Rezeptoren führt zu einem Calciumeinstrom (262) und zur Öffnung einer Membranpore (Kapitel 1.2.1) (87), die durchlässig für den Fluoreszenzfarbstoff YO-PRO-1 ist. Da der

P2X7-Rezeptorantagonist oxATP die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung senkte, sollte die Aktivität von Ap4 am P2X7-Rezeptor untersucht werden. Hierfür eignete sich YO-PRO-Färbung, wobei die Aufnahme von YO-PRO-1 durch Messung der Fluoreszenzintensität mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden kann. Da die Methode zur Untersuchung der P2X7-Rezeptoraktivierung etabliert werden musste, wurden die YO-PRO-Färbung in THP-1 Makrophagen zunächst mit dem P2X7-Rezeptoragonisten BzATP durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten hitzeabgetötete Zellen, deren Membran permeabel für YO-PRO-1 waren. In Vorversuchen zeigte sich nur eine sehr geringe Aufnahme von YO-PRO-1 in Gegenwart von BzATP (Abbildung 3.22 A und B). Deshalb wurde die YO-PRO-Färbung in Ap-stimulierten THP-1 Makrophagen nicht weiter verfolgt.

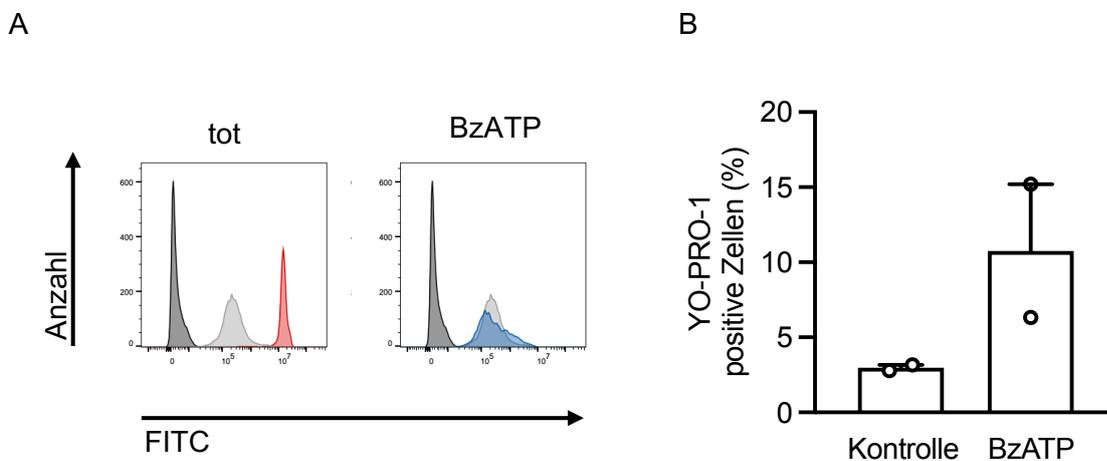


Abbildung 3.22: YO-PRO-Färbung in THP-1 Makrophagen. (A und B) THP-1 Makrophagen wurden mit YO-PRO-1 (2 μ M) beladen und für 1 Stunde ohne oder mit BzATP (300 μ M) stimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Veränderung der YO-PRO-1 Aufnahme bei Stimulation mit BzATP (blaue Kurve) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (hellgraue Kurven) bestimmt (gemessen an der Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal). Als Positivkontrolle wurden hitzegetötete Zellen benutzt (rote Kurve). Die dunkelgraue Kurve zeigt ungefärbte Zellen. Die Histogramme sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. (B) Die Prozentzahl der YO-PRO-1 positiven Zellen wurde als Verschiebung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle dargestellt. Der Graph zeigt die Mittelwerte + SEM, (n = 2).

Im nächsten Schritt wurden die Versuche an HEK293 Zellen durchgeführt, die den P2X7-Rezeptor überexprimieren. Durch Transfektion mit dem humanen P2X7-Rezeptor wurde eine hohe Expression des P2X7-Rezeptors erreicht, wohingegen native HEK293 Zellen und Zellen, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden, keine Expression P2X7-Rezeptors zeigten (Abbildung 3.23).

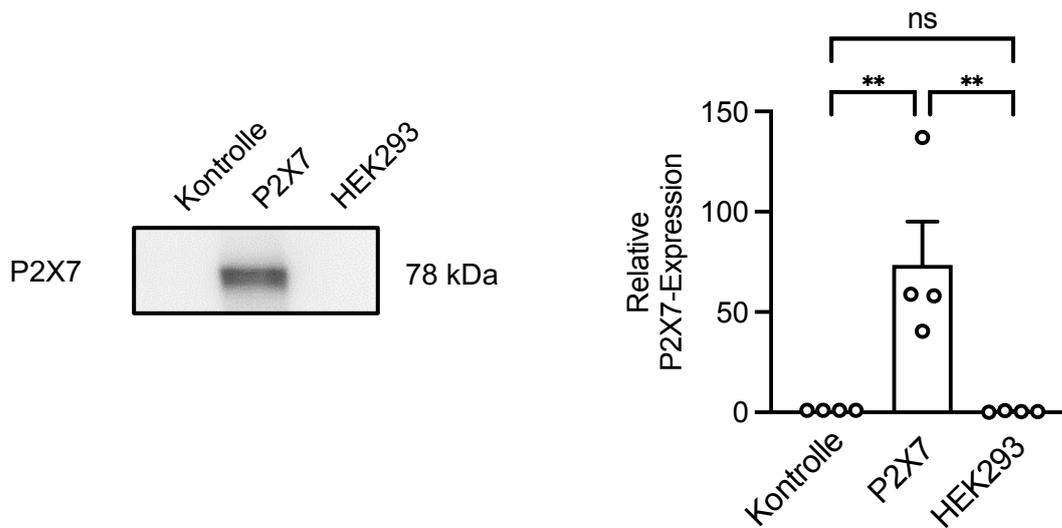
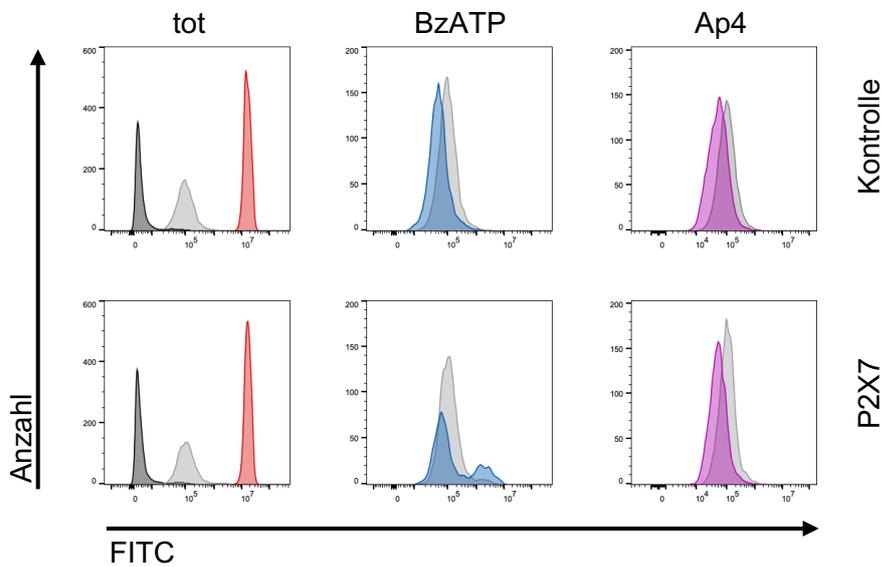


Abbildung 3.23: Die Transfektion der HEK293 Zellen mit dem P2X7-Rezeptor ist erfolgreich. HEK293 Zellen wurden mit dem P2X7-Rezeptor (pUNO1-hP2RX7) oder dem Kontrollplasmid (pUNO-mcs) transfiziert. Die P2X7-Rezeptor-Proteinlevel aus den Zelllysaten der transfizierten und untransfizierten HEK293 Zellen wurden mittels Western Blot Analytik bestimmt. Die Daten repräsentieren 4 unabhängige Experimente. Die P2X7-Rezeptor-Proteinlevel wurden auf die jeweilige Gesamtproteinmenge normalisiert und die jeweiligen Werte auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM, (n = 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, **P \leq 0.01, einfaktorische Varianzanalyse gefolgt von Tukey.

Während BzATP in P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen zu einer erhöhten Aufnahme von YO-PRO-1 gegenüber der unbehandelten Kontrolle führte, blieb ein Anstieg der Fluoreszenzintensität durch Ap4-Stimulation aus (Abbildung 3.24 A). Wurden die Histogramme von drei voneinander unabhängigen Experimenten ausgewertet, so zeigte sich, dass eine Stimulation von P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen mit BzATP die Anzahl der YO-PRO-1 positiven Zellen von 6 % auf 24 % signifikant erhöhte, während sie in Ap4-stimulierten Zellen unverändert blieb (Abbildung 3.24 B). Deshalb konnte angenommen werden, dass eine Stimulation mit Ap4 keine P2X7-Rezeptor-vermittelte Öffnung einer Membranpore zur Folge hat.

A



B

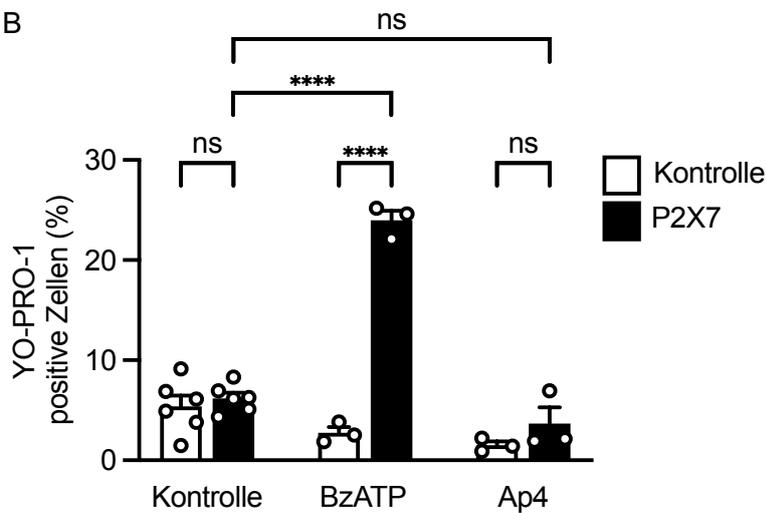


Abbildung 3.24: YO-PRO-Färbung in P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen. (A und B) HEK293 Zellen wurden mit dem P2X7-Rezeptor (pUNO1-hP2RX7) oder dem Kontrollplasmid (pUNO-mcs) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit YO-PRO-1 (2 μ M) beladen und für 1 Stunde ohne, mit BzATP (300 μ M) oder Ap4 (5 mM) stimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Veränderung der YO-PRO-1 Aufnahme durch Stimulation mit Ap4 oder BzATP (farbige Kurven) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (hellgraue Kurven) bestimmt (gemessen an der Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal). Als Positivkontrolle wurden hitzegetötete Zellen benutzt (rote Kurven). Die dunkelgraue Kurve zeigt ungefärbte Zellen. Die Histogramme sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. (B) Die Prozentzahl

der YO-PRO-1 positiven Zellen wurde als Verschiebung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Der Graph zeigt die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 6). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, ****P \leq 0.0001, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Tukey.

Um die Aktivität von Ap4 am P2X7-Rezeptor in transfizierten HEK293 Zellen genauer zu untersuchen, wurde auch der Calciumeinstrom während der Stimulation mit Ap4 oder der Referenzsubstanz BzATP gemessen. Calcimycin, ein Calcium Ionophor, das unabhängig von der P2X7-Rezeptoraktivität zur Calciumfreisetzung in die Zelle führt, wurde als Positivkontrolle verwendet und führte zu einem Anstieg des Calciumeinstroms in beiden Zelltypen, was die funktionelle Integrität der Zellen bestätigte (Abbildung 3.25). In den mit dem Kontrollplasmid transfizierten HEK293 Zellen führte weder die Zugabe von BzATP noch von Ap4 zu einer Steigerung der Fluoreszenzintensität gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Wurde BzATP hingegen den HEK293 Zellen zugefügt, die mit dem P2X7-Rezeptor transfiziert wurden, führte dies zu einem messbaren Calciumeinstrom in die Zelle. Im Gegensatz dazu konnte durch die Zugabe von Ap4 zu P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen kein Calciumeinstrom gemessen werden.

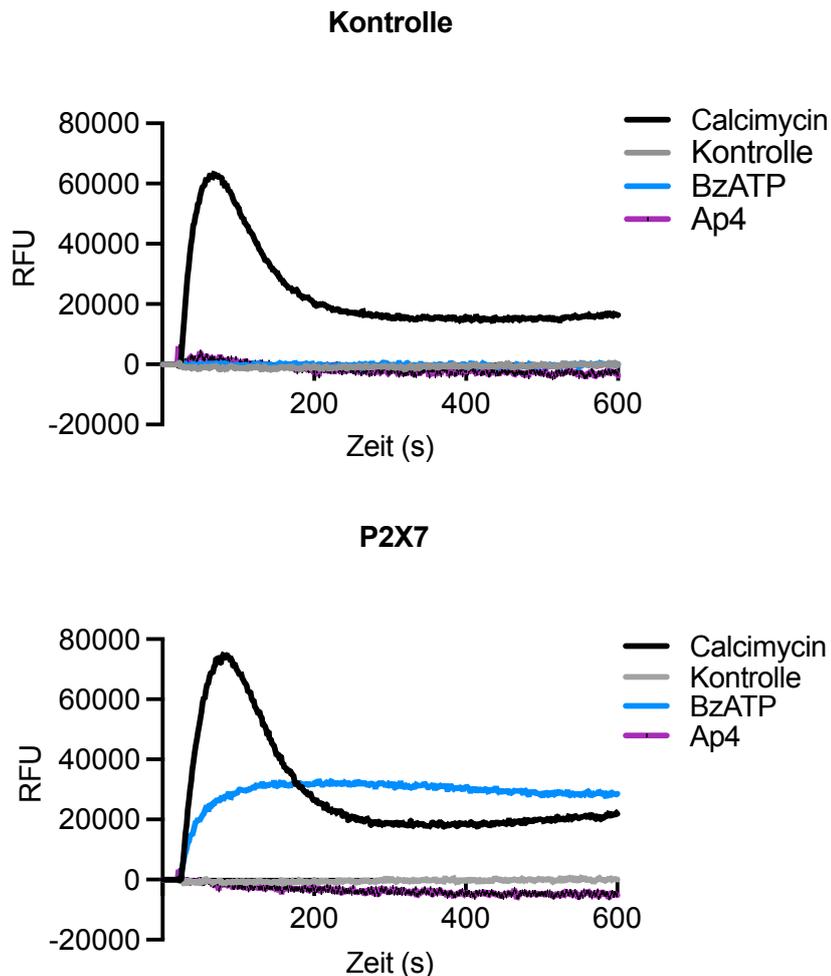


Abbildung 3.25: In P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen vermittelt die Ap4-Stimulation keinen Calciumeinstrom. HEK293 Zellen wurden mit dem P2X7-Rezeptor (pUNO1-hP2RX7) oder dem Kontrollplasmid (pUNO-mcs) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit Fluo-4 AM und Probenecid beladen. Endkonzentrationen von Ap4 5 mM, BzATP 300 μ M oder Calcimycin 10 μ M wurden nach 20 Sekunden zugegeben. Der Calciumeinstrom wurde mittels Fluoreszenzintensitätsmessung bestimmt. Der Graph zeigt die Mittelwerte bezogen auf das Basallevel (n = 3).

Obwohl die vorliegenden Daten darauf hindeuten, dass Ap4 den P2X7-Rezeptor nicht aktiviert, konnte die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung dennoch durch den P2X7-Rezeptorantagonisten oxATP reduziert werden. Deshalb wurde im nächsten Schritt untersucht, ob Ap4 die Aktivierung des P2X7-Rezeptors beeinträchtigen könnte. In Anwesenheit von Ap4 konnte eine 55%ige Reduktion der BzATP-vermittelten IL-1 β -Zytokinspiegel beobachtet werden (Abbildung 3.26). Dies könnte darauf hindeuten, dass Ap4 die Wirkung von BzATP am P2X7-Rezeptor verhindert, indem es selbst mit dem P2X7-Rezeptor interagiert.

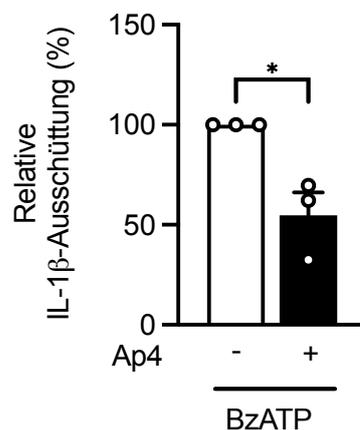


Abbildung 3.26: Ap4 als P2X7-Rezeptor-Modulator. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit BzATP (300 μ M) stimuliert. Ap4 (5 mM) wurde eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: *P \leq 0.05, Einstichproben-t-Test gegen 100 %.

3.2.5 Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig vom K⁺ Ausstrom und dem NLRP3-Inflammasom

Wie bereits gezeigt werden konnte, ist der K⁺-Ausstrom aus der Zelle für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms entscheidend. Um zu überprüfen, ob die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung abhängig vom NLRP3-Inflammasom ist, wurde daher zunächst überprüft, ob die Inhibierung des K⁺-Ausstroms einen Effekt auf die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung hat. Während die Erhöhung der

extrazellulären Kaliumkonzentration durch Zugabe von Kaliumchlorid den K^+ -Efflux und die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung verhinderte (Abbildung 3.5), blieb die IL-1 β -Freisetzung durch Ap4 in Anwesenheit von Kaliumchlorid unverändert (Abbildung 3.27). Dadurch konnte gezeigt werden, dass Ap4 in THP-1 Makrophagen eine Signalkaskade aktiviert, die unabhängig vom Kaliumausstrom eine IL-1 β -Freisetzung zur Folge hat.

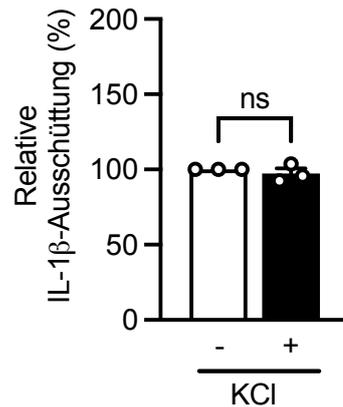


Abbildung 3.27: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig vom K^+ -Efflux. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann in Anwesenheit von 75 mM Kaliumchlorid 3 Stunden mit Ap4 (5 mM) stimuliert. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, Einstichproben-t-Test gegen 100 %.

Auf Grund der oben gezeigten Ergebnisse wurde als nächstes überprüft, ob Ap4 das NLRP3-Inflammasom unabhängig vom K^+ -Efflux aktiviert. Dafür wurde die Veränderung der Ap4-induzierten IL-1 β -Freisetzung in Anwesenheit der NLRP3-Inhibitoren MCC950 und Bay 11-7082 untersucht. In Ap4-stimulierten Zellen wurden die IL-1 β -Zytokinspiegel weder durch die Zugabe von MCC950 noch durch Bay 11-7082 gesenkt, was zeigt, dass die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung NLRP3-unabhängig ist (Abbildung 3.28 A). Dieses Ergebnis konnte bestätigt werden, da Ap4 in *geprimten* THP-1 Makrophagen mit einem NLRP3-Knockout zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung führte (Abbildung 3.28 B).

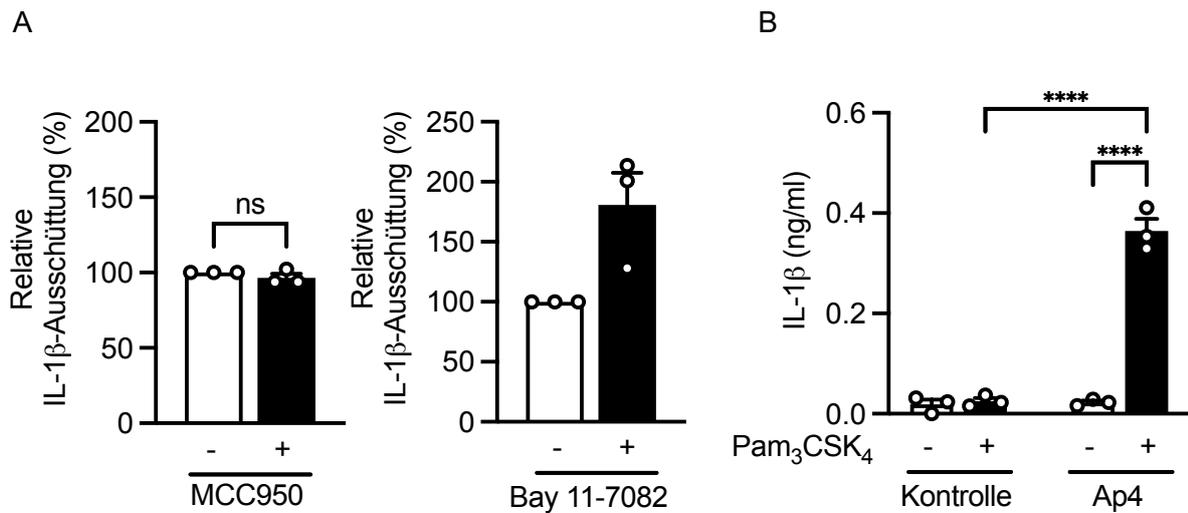


Abbildung 3.28: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist NLRP3-unabhängig. (A) THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap4 (5 mM) stimuliert. NLRP3-Inhibitoren MCC950 (10 μ M) und Bay-11.7082 (20 μ M) wurden eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, Einstichproben-t-Test gegen 100 %. (B) NLRP3 KO THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap4 (5 mM) stimuliert. Die IL-1 β -Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA analysiert. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ****P \leq 0.0001, einfaktorische Varianzanalyse gefolgt von Tukey.

3.2.6 Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig von Caspasen

Da Ap4 einen Signalweg aktiviert, der zu einer NLRP3-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung führt, wurde weiter untersucht, ob die Caspase-1 unabhängig von der NLRP3-Aktivität an der IL-1 β Verarbeitung durch Ap4 beteiligt ist. Zuvor wurde bereits gezeigt, dass der Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD-cmk und der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk effektiv die NLRP3-abhängige IL-1 β -Freisetzung hemmen konnten (Abbildung 3.7 A). Durch Hemmung der Caspase-Aktivität blieb jedoch die Ap4-induzierte IL-1 β -Sekretion unverändert (Abbildung 3.29 A), was zeigt, dass die Caspase-1 in Ap4-stimulierten Makrophagen nicht an der Spaltung von Pro-IL-1 β in die aktive Form beteiligt ist. Die Analyse der Proteingehalte von Pro-IL-1 β , Pro-Caspase-1 und der aktiven Caspase-1 in Pam₃CSK₄-*geprimten* THP-1 Makrophagen mittels Western Blot konnten diese Ergebnisse bestätigen. In Ap4-stimulierten Makrophagen fand keine Spaltung der Pro-Caspase-1 statt, während eine Stimulation mit dem NLRP3-Aktivatoren Nigericin zu einer Aktivierung der Caspase-1 führte (Abbildung 3.29 B).

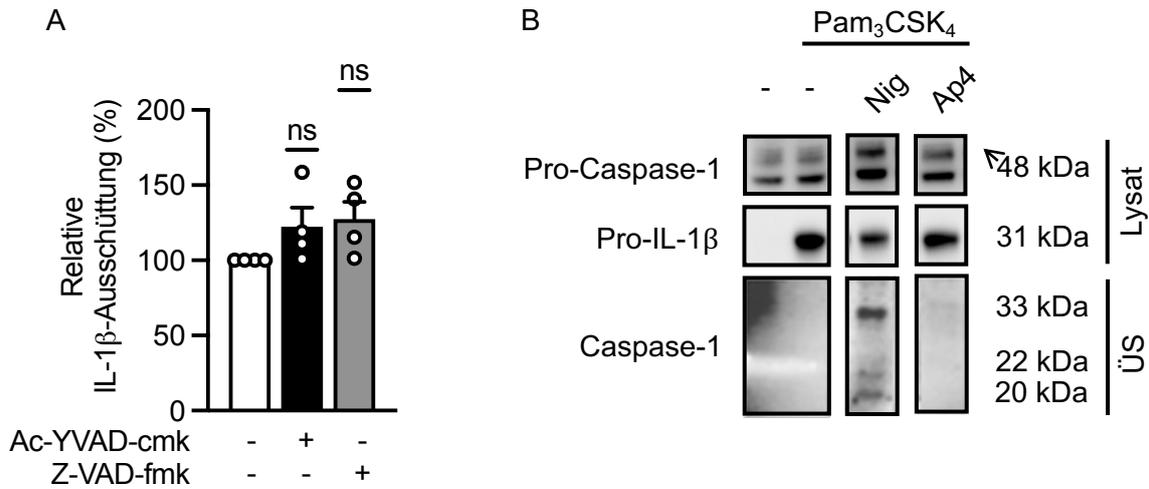


Abbildung 3.29: Die Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist Caspase-1 unabhängig. (A) THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap₄ (5 mM) stimuliert. Der Caspase-1-Inhibitor Ac-YVAD-cmk (40 μ M) oder der Pan-Caspase-Inhibitor Z-VAD-fmk (40 μ M) wurde eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, Einstichproben-t-Test gegen 100 %. (B) THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap₄ (5 mM) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. Die Pro-Caspase-1- und Pro-IL-1 β -Proteinlevel aus den Zelllysaten und die Proteinlevel der Caspase-1 aus den Zellkulturüberständen (ÜS) wurden mittels Western Blot Analytik bestimmt. Die Daten repräsentieren 2 unabhängige Experimente.

Im Allgemeinen gestaltete sich die Detektion der Caspase-1 im Western Blot als schwierig. So wurden im Verlauf der Arbeit verschiedene Methoden zur Anreicherung der Proteinmenge im Überstand getestet und verschiedene Stimulationszeiten untersucht. Da nur geringe Mengen an aktiver Caspase-1 in THP-1 Makrophagen detektiert werden, wurde die Analyse auch in THP-1 Monozyten durchgeführt. Diese lassen sich unter gleichen Versuchsbedingungen in einer höheren Zellzahl kultivieren, sodass stärkere Effekte erwartet wurden.

Während im Überstand Pam₃CSK₄-*geprimter* THP-1 Makrophagen, die mit Nigericin stimuliert wurden, die p33-Form der Caspase-1 dominierte (Abbildung 3.29), konnte in THP-1 Monozyten sowohl die p33-, als auch die p20-Form nachgewiesen werden (Abbildung 3.30). In Pam₃CSK₄ *geprimten* THP-1 Monozyten wurde die Caspase-1 durch Nigericin aktiviert, durch die Stimulation mit Ap₄ blieb die Caspase-1 inaktiv (Abbildung 3.30). Folglich ist die Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung unabhängig von der Caspase-1.

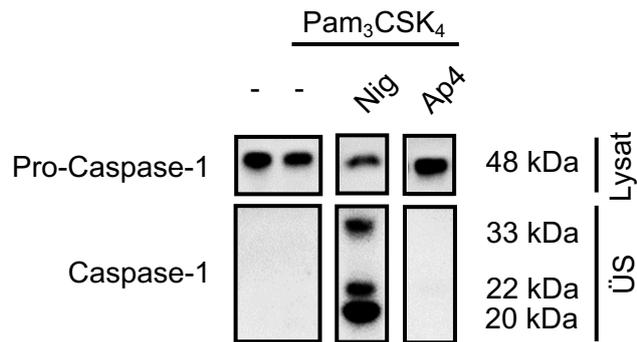


Abbildung 3.30: In THP-1 Monozyten ist die Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung Caspase-1-unabhängig. THP-1 Monozyten wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 6 Stunden mit Ap₄ (5 mM) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. Die Pro-Caspase-1-Proteinlevel aus den Zelllysaten und die Proteinlevel der Caspase-1 aus den Zellkulturüberständen (ÜS) wurden mittels Western Blot Analytik bestimmt. Die Daten repräsentieren 2 unabhängige Experimente.

3.2.7 Die Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig von Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen

Es wurden bereits Mechanismen zur Verarbeitung von Pro-IL-1 β beschrieben, die unabhängig vom NLRP3-Inflammasom und der Caspase-1 sind, dafür aber Serinproteasen beinhalten (258,263). Deswegen wurde untersucht, ob Serinproteasen oder andere Proteasen an der IL-1 β -Freisetzung durch Ap₄ beteiligt sind. Die Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde weder durch den Serinprotease-Inhibitor AEBSF noch durch den Cysteinprotease-Inhibitor E64 beeinflusst (Abbildung 3.31 A und B). Auch in Gegenwart des Aspartatprotease-Inhibitors Pepstatin A blieben die Zytokinspiegel unverändert (Abbildung 3.31 C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung über einen Signalweg ausgelöst wird, der auch unabhängig von Serin-, Cystein- oder Aspartatproteasen ist. Daraus resultiert die Annahme, dass Pro-IL-1 β durch andere Spaltungsmechanismen in aktives IL-1 β überführt werden kann.

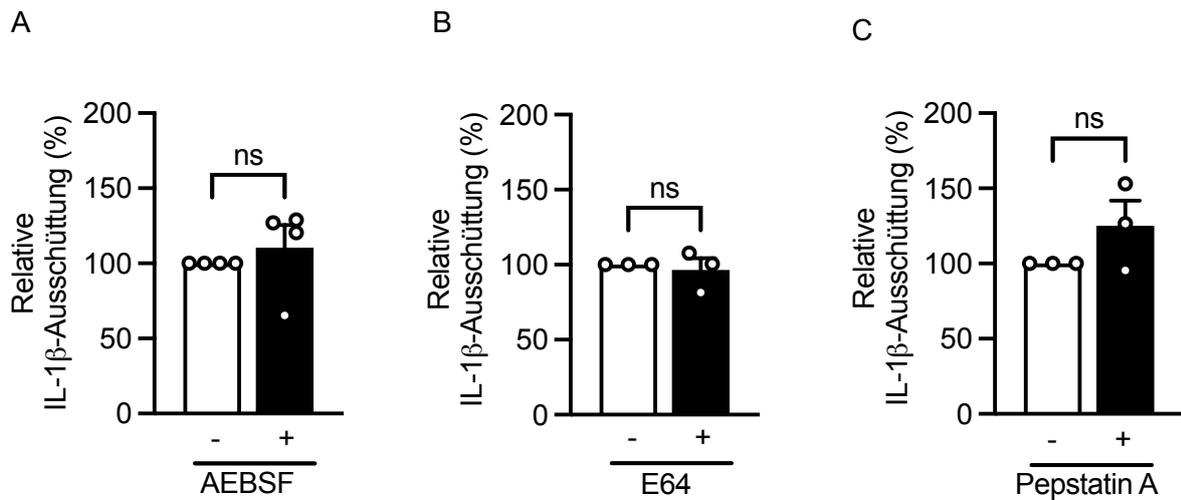


Abbildung 3.31: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig von Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap4 (5 mM) stimuliert. Inhibitoren der (A) Serinprotease (AEBSF, 300 μ M), (B) Cysteinprotease (E64, 10 μ M) oder (C) Aspartatprotease (Pepstatin A, 50 μ M) wurden eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3 - 4). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, Einstichproben-t-Test gegen 100 %.

3.2.8 Untersuchung der IL-1 β -Freisetzung in U937 Makrophagen

Wie bereits gezeigt wurde, eignet sich die THP-1 Zelllinie zu Untersuchungen des NLRP3-Inflammasoms. Da neben THP-1 Zellen auch U937 Zellen als Modell zu Untersuchungen des NLRP3-Inflammasoms verwendet werden (22), wurden die Effekte von Ap4 auch in U937 Zellen untersucht.

Die grundlegenden Unterschiede zwischen U937 und THP-1 Zellen sind die Herkunft und das Reifestadium. U937 Zellen sind gewebeansässig und in einem reiferen Stadium, während THP-1-Zellen aus einem Patienten mit einer akuten monozytären Leukämie stammen und in einem weniger reifen Zustand sind (212,214). Auch die promonozytären U937 Makrophagen können in makrophagenartige Zellen differenziert werden und weisen in Bezug auf Morphologie und biologische Reaktionen Ähnlichkeiten mit primären Makrophagen auf (212). Die Differenzierung von U937 Promonozyten in Makrophagen kann durch die Behandlung der U937 Zellen mit Vitamin D₃, 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) oder PMA erreicht werden (213,264). Die Methode wurde in unserer Arbeitsgruppe zunächst etabliert, wobei für die Differenzierung der U937 Makrophagen ebenso wie für die Differenzierung der THP-1 Makrophagen PMA verwendet wurde. Da sich die

Differenzierungsmethoden für U937 Makrophagen in der Literatur unterscheiden (212,265–270), wurden die U937 Zellen zunächst für 48 Stunden mit 25 ng/ml PMA behandelt, was eine häufig verwendete Expositionsdauer mit PMA in der Literatur darstellt (267,268,271,272) und auch für die Differenzierung der THP-1 Makrophagen verwendet wurde. Allerdings waren die U937 Zellen nach dieser Zeit kaum adhären und ließen sich leicht von der Zellkulturplatte ablösen, weswegen eine alternative Methode entwickelt werden musste. In der Literatur ist auch eine 72-stündige PMA-Behandlung mit anschließender 24-stündiger Erholungszeit in PMA-freiem Medium für die Differenzierung der U932 Makrophagen beschrieben worden (273). Da bereits gezeigt wurde, dass die Exposition von U937 Promonozyten mit PMA für 72 Stunden die Expression des makrophagentypischen Oberflächenmarkers CD14 induzierte (265), wurde die PMA-Inkubationszeit auf 72 Stunden verlängert. Zunächst wurde für die Differenzierung eine PMA-Konzentration von 50 ng/ml gewählt. Um zu überprüfen, ob sich der verwendete Zeitraum für eine Differenzierung eignet, wurde die Expression der für die U937 Makrophagen typischen Oberflächenmarker CD14, CD11b, CD11c und CD86 (264,265,274–276) in unbehandelten und mit PMA-behandelten Zellen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung über 72 Stunden mit 50 ng/ml PMA mit einer anschließenden Ruhephase von 24 Stunden die Expression der genannten Oberflächenmarker im Vergleich zu undifferenzierten Zellen erhöhte (Abbildung 3.32 A). Da in der Literatur unterschiedliche PMA-Konzentrationen für die Differenzierung verwendet werden (265,269,270), wurden U937 Zellen mit verschiedene PMA-Konzentrationen (25, 50 und 100 ng/ml) behandelt und der Einfluss der PMA-Konzentration unter der getesteten zeitlichen Bedingung untersucht. Die Expression des Makrophagen-Oberflächenmarkers CD11b in differenzierten U937 Makrophagen konnte durch alle getesteten PMA-Konzentrationen auf vergleichbare Weise erhöht werden (Abbildung 3.32 B).

Eine PMA-Behandlung stimuliert die PKC-Signalkaskade in U937 Zellen und erhöht die Expression von mehreren Transkriptionsfaktoren, darunter NF- κ B (266). NF- κ B ist ein entscheidender Faktor für die Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und kann durch den TLR4-Liganden LPS aktiviert werden (277). Die Stimulation der U937 Makrophagen mit LPS erhöhte die TNF-Freisetzung gegenüber der unstimulierten Kontrolle unabhängig von der PMA-Konzentration (Abbildung 3.32 C). Die promonozytären U937 Zellen setzten nach Stimulation mit LPS kein TNF frei.

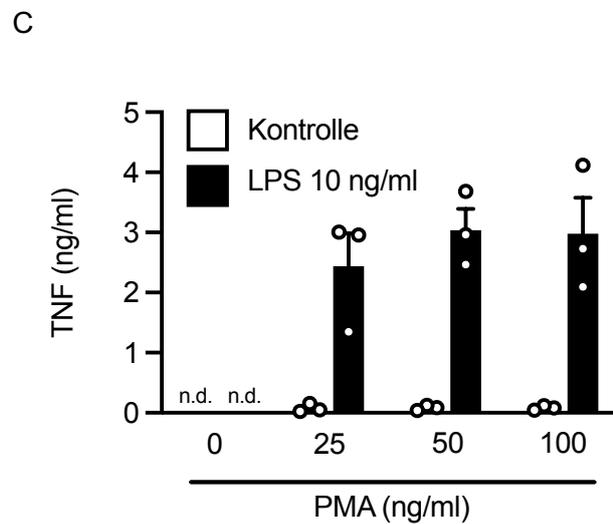
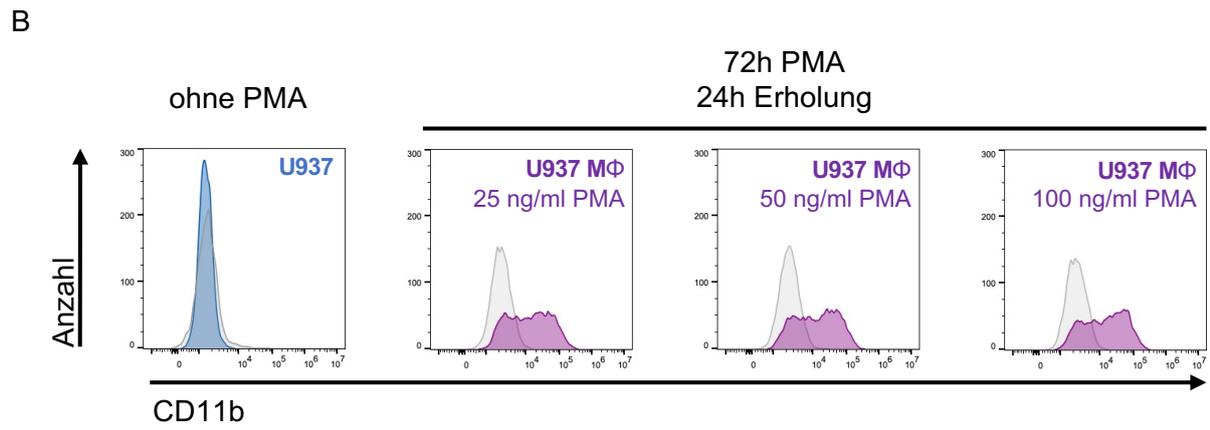
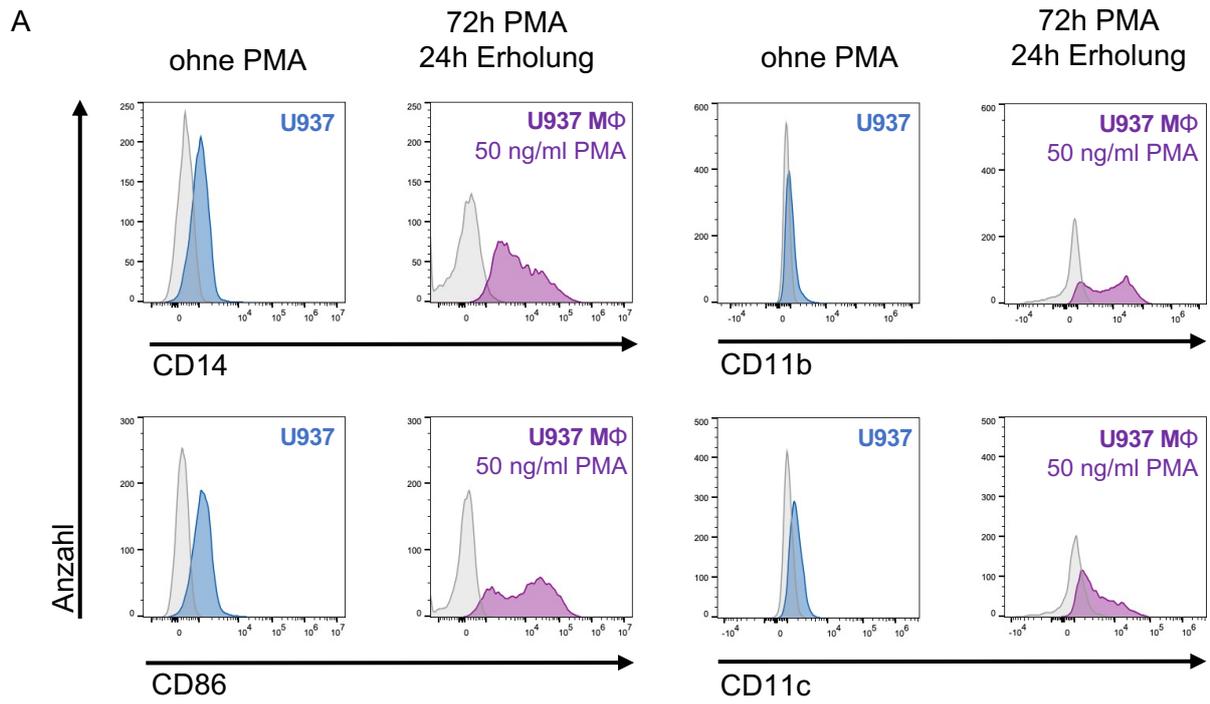


Abbildung 3.32: Aus U937 Promonozyten generierte Makrophagen exprimieren typische Differenzierungsmarker und reagieren auf LPS. (A) U937 Zellen wurden für 72 Stunden ohne oder mit 50 ng/ml PMA behandelt. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Erholungsphase in PMA-freien Medium. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Veränderung der Oberflächenmarker CD14, CD11b, CD11c und CD86 (farbige Kurven) im Vergleich zu den jeweiligen FMO-Kontrollen (graue Kurven) gemessen. Die Diagramme sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. (B und C) U937 Zellen wurden für 72 Stunden ohne oder mit 5, 50 oder 100 ng/ml PMA behandelt. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Erholungsphase in PMA-freien Medium. (B) Mittels Durchflusszytometrie wurde die Veränderung des Oberflächenmarkers CD11b (farbige Kurven) im Vergleich zu den jeweiligen FMO-Kontrollen (graue Kurve) gemessen. Die Diagramme sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente. (C) Im Anschluss an die Erholungsphase wurden die Zellen mit LPS (10 ng/ml) stimuliert. Die TNF-Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde nach 4 Stunden mittels ELISA bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert + SEM (n = 3).

Für weitere Experimente in U937 Makrophagen wurde für die Differenzierung eine Stimulation über 72 Stunden mit 50 ng/ml PMA gewählt, auf die eine Erholungsphase von 24 Stunden folgte.

Die Morphologie der promonozytären U937 Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie mit denen der U937 Makrophagen verglichen (Abbildung 3.33). Dabei konnte gezeigt werden, dass U937 Makrophagen eine höhere Granularität aufweisen (erkennbar durch eine Signalverschiebung im *side scatter* (SSC)-Kanal) und größer sind (erkennbar durch eine Signalverschiebung im *forward scatter* (FSC)-Kanal), was durch die Ausbildung der für die Makrophagen typischen Ausstülpungen (Pseudopodien) zustande kommt (272).

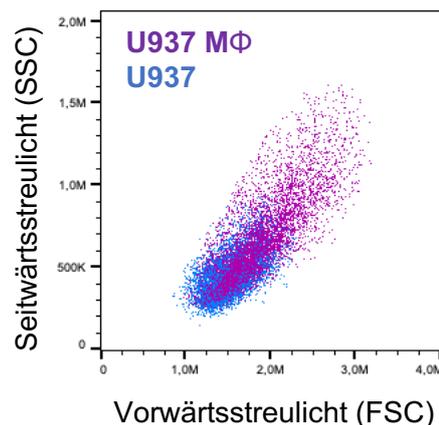


Abbildung 3.33: Morphologische Unterschiede von U937 Promonozyten und Makrophagen. U937 Zellen zeigten unbehandelt oder nach 72 Stunden mit PMA (50 ng/ml) eine unterschiedliche Verteilung im Dot Plot bei der Messung mittels Durchflusszytometrie. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

3.2.8.1 Ap4 vermittelt eine NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung in U937 Makrophagen

Um zu untersuchen, ob Ap4 in U937 Makrophagen IL-1 β freisetzt, wurden U937 Makrophagen mit Pam₃CSK₄ *geprimt* und anschließend mit Ap4 stimuliert. Im Gegensatz zu PBMCs, THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen, bei denen ein *Priming* mit Pam₃CSK₄ erforderlich war, damit Ap4 eine IL-1 β -Freisetzung induzierte (Abbildungen 3.13, 3.15 und 3.16), führte die Stimulation mit Ap4 in U937 Makrophagen auch ohne *Priming* zu erhöhten IL-1 β -Zytokinspiegeln (Abbildung 3.34 A). Allerdings erhöhte ein TLR2/1-*Priming* die IL-1 β -Spiegel weiter. Deswegen wurden für folgende Untersuchungen der NLRP3-Abhängigkeit von Ap4 *geprimte* U937 Makrophagen verwendet. Im Vergleich zu *geprimten* THP-1 Makrophagen war die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in *geprimten* U937 Makrophagen um etwa das 84-fache erhöht. Interessanterweise hatte Ap4 in *geprimten* U937 Makrophagen einen stärkeren Effekt auf die IL-1 β -Freisetzung als ATP. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen in THP-1 Makrophagen, bei denen Ap4 eine geringere Menge IL-1 β freisetzte als ATP (Abbildungen 3.3 und 3.16). U937 Monozyten setzten nach Stimulation mit Ap4 oder ATP kein IL-1 β frei (Daten nicht gezeigt). Eine Stimulation von *ungeprimten* und *geprimten* U937 Makrophagen mit Ap4 führte zu keiner erhöhten Freisetzung von TNF gegenüber der unstimulierten oder nur mit Pam₃CSK₄-inkubierten Kontrolle (Abbildung 3.34 B).

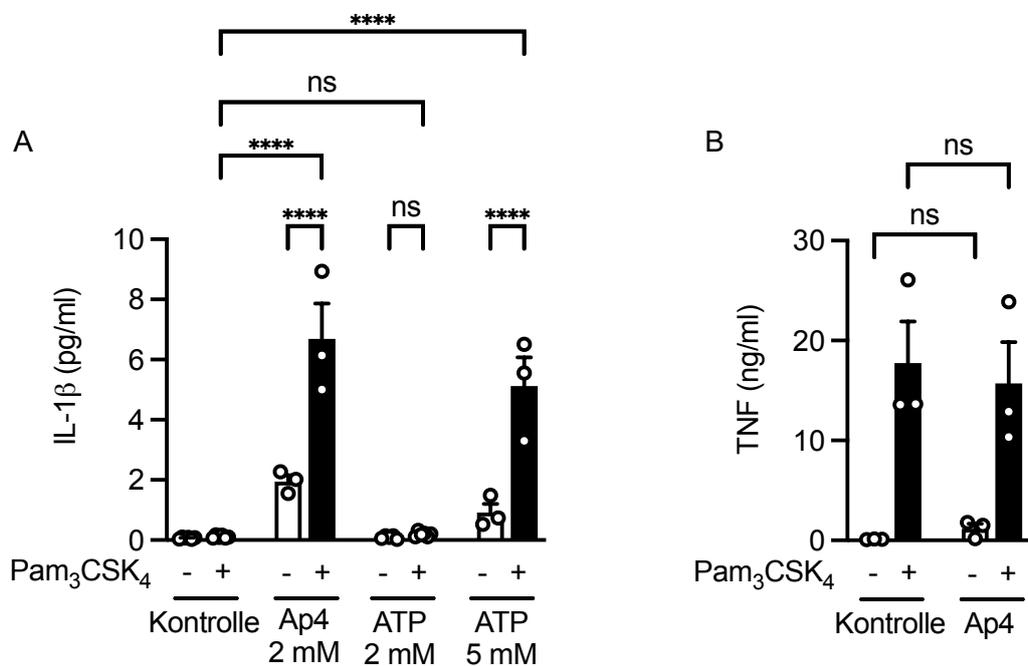


Abbildung 3.34: In U937 Makrophagen induziert Ap4 die Freisetzung von IL-1 β . U937 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap4 (2 mM) oder ATP (2 und 5 mM) stimuliert. (A) Die IL-1 β und (B) TNF-Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA

bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns ≥ 0.05 , ****P ≤ 0.0001 , einfaktorielles Varianzanalyse gefolgt von Tukey.

Um zu untersuchen, ob die IL-1 β -Freisetzung durch Ap4 in U937 Makrophagen vom NLRP3-Inflammasom abhängig ist, wurde der NLRP3-Inhibitor MCC950 verwendet. Während die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch MCC950 gesenkt wurde, blieb die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in Anwesenheit von MCC950 auch in U937 Makrophagen unverändert (Abbildung 3.35 A). Obwohl etwa 4-fach höhere Konzentrationen von MCC950 erforderlich waren, um das NLRP3-Inflammasom in U937 Makrophagen zu hemmen, wurde die Zellviabilität durch MCC950 nicht beeinträchtigt (Abbildung 3.28 B). Diese Ergebnisse gehen mit den vorherigen Untersuchungen in THP-1 Makrophagen einher (Abbildung 3.28) und deuten darauf hin., dass Ap4 in Makrophagen zu einer IL-1 β -Freisetzung führt, die unabhängig vom NLRP3-Inflammasom ist.

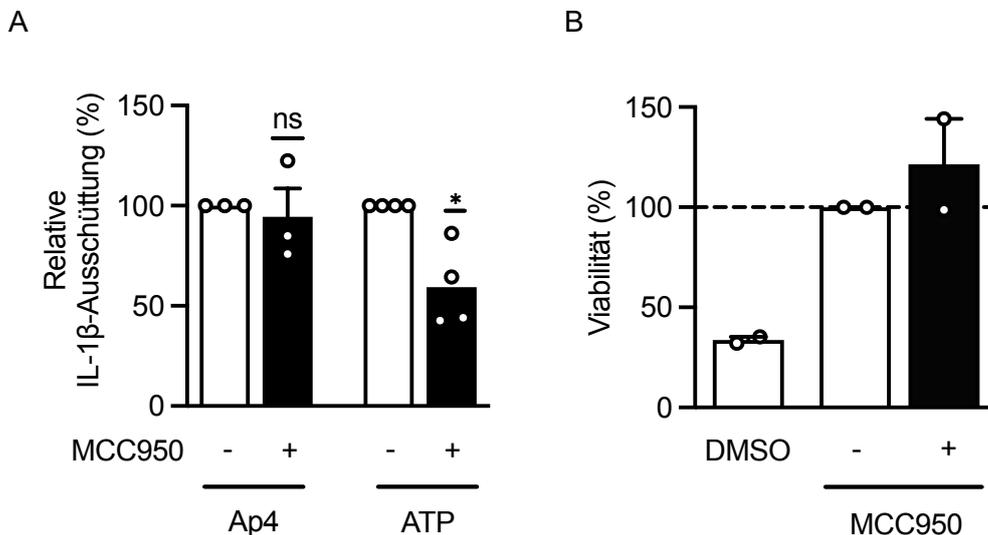
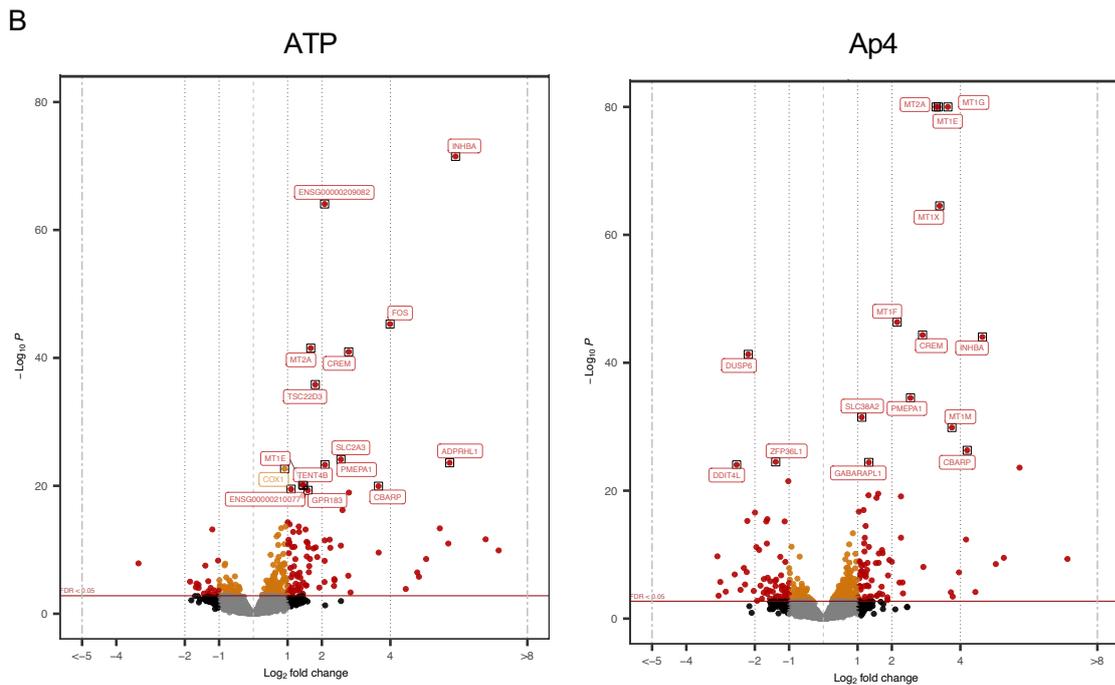
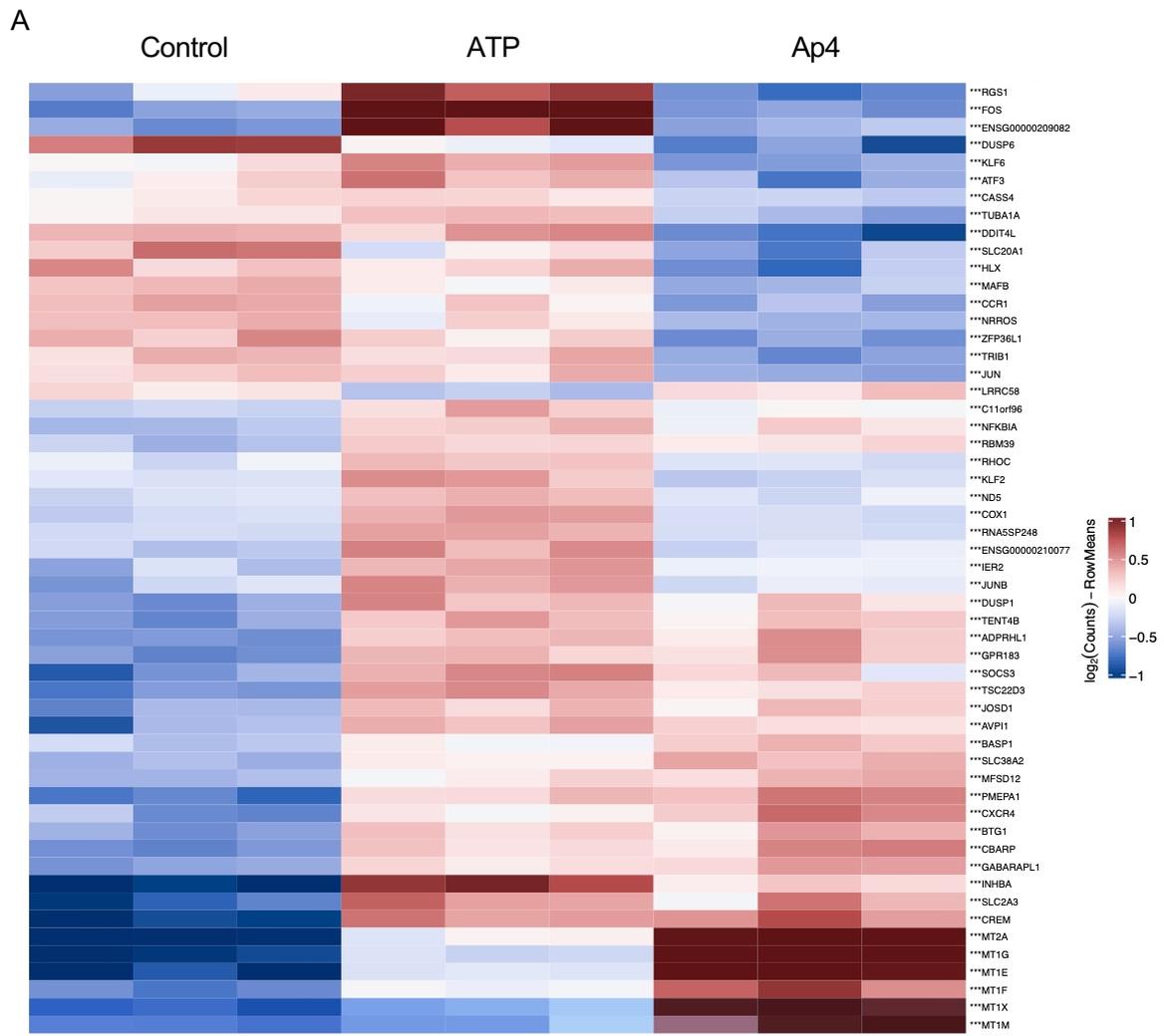


Abbildung 3.35: Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in U937 Zellen ist NLRP3-unabhängig. U937 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit Ap4 (2 mM) oder ATP (5 mM) stimuliert. Der NLRP3-Inhibitor MCC950 (40 μ M) wurde eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die durch Ap4- oder ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Statistische Unterschiede: ns ≥ 0.05 , *P ≤ 0.05 , Einstichproben-t-Test gegen 100 %. (B) U937 Makrophagen wurden mit MCC950 (40 μ M) stimuliert. Die Zellviabilität wurde nach 7 Stunden mittels MTT-Tests bestimmt, wobei DMSO (10 % v/v) als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Die Viabilität wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 100 %). Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 2 - 4).

3.2.9 Ap4, aber nicht ATP, induziert die Expression von Metallothioneinen

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass ATP und Ap4 trotz struktureller Ähnlichkeiten die Freisetzung von IL-1 β über unterschiedliche Mechanismen regulieren. Deshalb wurde eine Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierbei sollten die genomweiten Expressionsprofile von ATP und Ap4 in Makrophagen miteinander verglichen werden, um die Unterschiede im Mechanismus der IL-1 β -Freisetzung zu erklären und einen Ausblick für weitere Untersuchungen zu liefern. Am auffälligsten war, dass Ap4 die Expression der Metallothioneine *MT2A*, *MT1G*, *MT1E*, *MT1F*, *MT1X* und *MT1M* signifikant erhöhte, wohingegen dieser Effekt bei ATP im Vergleich zur Kontrolle sehr gering war. Metallothioneine stehen in Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen (Abbildung 3.36 A und B) (278–280), was einen interessanten Ansatz zur Untersuchung der individuellen Effekte von Ap4 auf die Entzündung bietet. Während ATP die Expression von *FOS* (*fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit*) erhöhte (Abbildung 3.36 A und B), blieben die Expressionslevel durch Ap4-Stimulation unverändert. Da die Aktivierung von c-FOS an die Aktivierung des P2X7-Rezeptors gekoppelt ist (281,282), steht dies mit den bisherigen Ergebnissen in Einklang. In Tumorgewebe mit erhöhten extrazellulären ATP-Spiegeln wird durch Aktivierung des P2X7-Rezeptors c-FOS aktiviert und fördert das Tumorstadium durch die Erhöhung der Zellproliferation und Migration (281). Der Volcanoplot zeigt, dass Ap4 signifikante Veränderungen in der Expression mehrerer Gene bewirkte, wobei Gene sowohl hoch- als auch runterreguliert wurden (Abbildung 3.36 B). Durch ATP hingegen kam es vermehrt zu einer Hochregulation der Expression verschiedener Gene. Die Gen Ontology (GO)-Anreicherungsanalyse zeigte, dass die durch ATP und Ap4 am stärksten veränderten Gene hauptsächlich an den biologischen Prozessen "Stressreaktionen auf Metallionen", "zelluläre Antwort auf Zink Ionen" und "zelluläre Reaktion auf Kupfer" beteiligt waren (Abbildung 3.36 C), was zumindest bei Ap4 in Zusammenhang mit der gesteigerten Expression der Metallothioneine stehen könnte, da diese Metallionen wie Zink und Kupfer binden (283).



C **Biological Process**

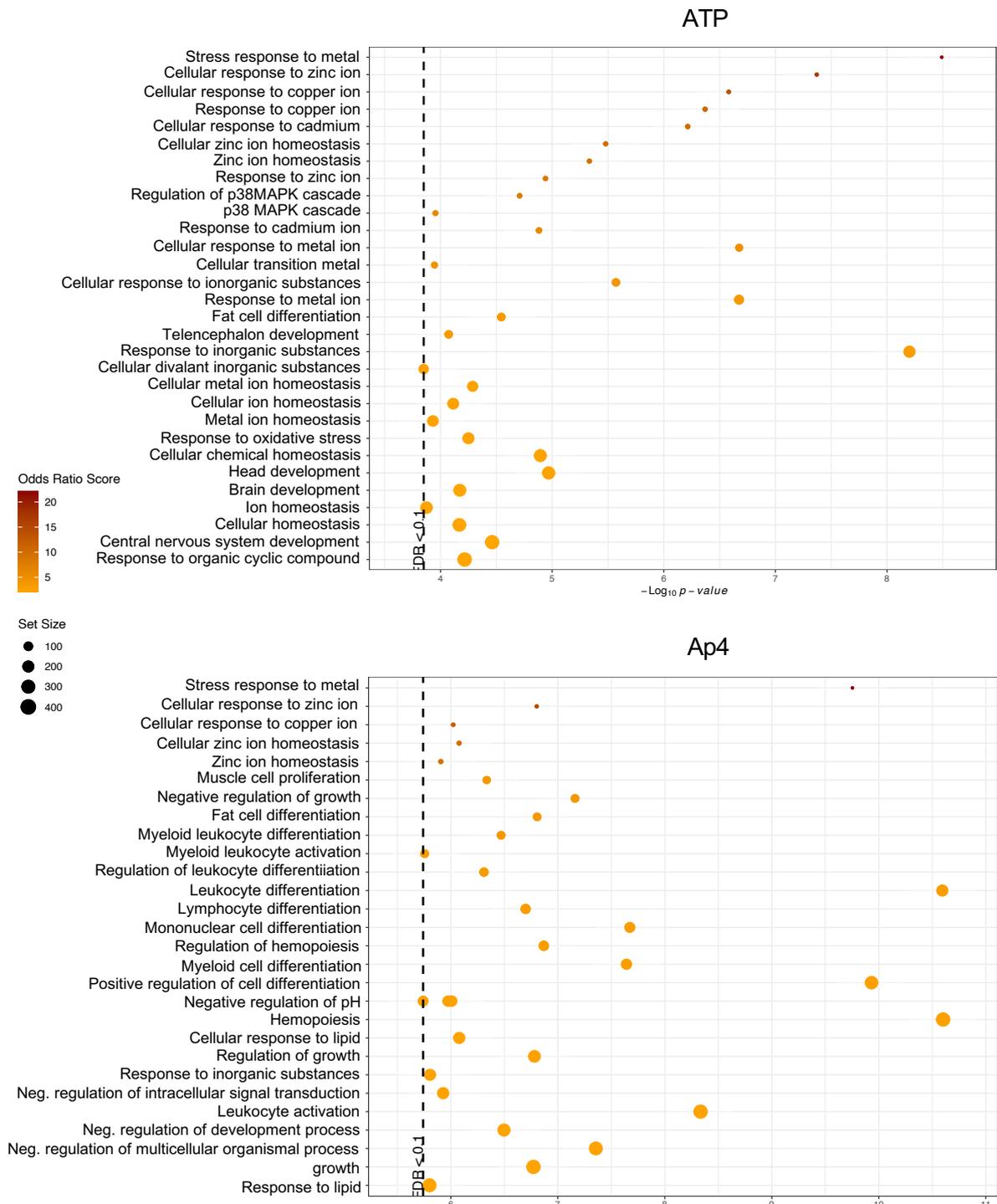


Abbildung 3.36: RNA-Sequenzierung und Gene-Ontology Analyse von THP-1 Makrophagen, die mit ATP oder Ap4 behandelt wurden. THP-1 Makrophagen wurden 3 Stunden mit RPMI, Ap4 (5 mM) oder ATP (5 mM) behandelt. Anschließend wurde eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. (A) Die

Genexpressiondaten für 54 differenziell exprimierte Gene (DEGs) werden durch die Intensität der Farbe als log₂-Fachveränderung von drei unabhängigen Experimenten als Heatmap dargestellt, wobei rot für eine höhere Expression und blau für eine niedrigere Expression steht. Log₂(normalisierte Zählungen pro Million) sind zeilenweise skaliert. DEGs definiert als Gene mit einem logarithmischen Zweifachveränderungswert von weniger als -1 oder mehr als +1. (B) Volcano-Plot aller 9508 identifizierten Gene zeigt die DEGs nach Behandlung mit ATP (links) oder Ap4 (rechts) im Vergleich zur Kontrolle (RPMP). Die negativen log₁₀-transformierten p-Werte (y-Achse) wurden gegen die durchschnittliche log₂-fache Veränderung (x-Achse) der Genexpression aufgetragen. Transkripte mit einem p-Wert < 0,5 wurden als statistisch signifikant eingestuft (die rote Linie zeigt die Grenzwerte für den p-Wert an). DEGs sind definiert als Gene mit einer logarithmischen zweifachen Veränderung von weniger als -1 oder mehr als +1. Signifikant differenziell exprimierte Transkripte sind rot gekennzeichnet. (C) Dotplots der Gene Ontology (GO)-Anreicherungsanalyse, die angereicherte biologische Prozesse zeigt, sortiert nach absolutem Score. Die Farben geben das Chancenverhältnis (*Odds ratio*) an, die Größe der Punkte steht für die Anzahl der DEGs in dem jeweiligen Signalweg.

3.3 Einfluss von HDAC6 auf NLRP3-vermittelte Entzündungsreaktionen

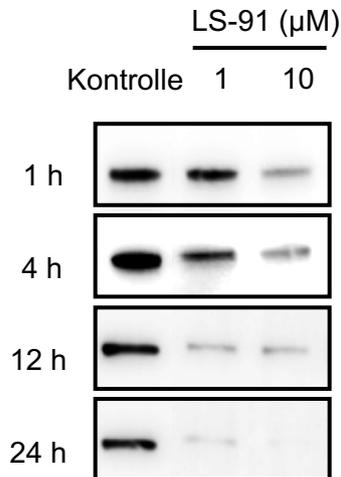
Bisher konnte gezeigt werden, dass HDAC6 in Mauseellen für den Aufbau und die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms verantwortlich ist (42). Um zu verstehen, wie die IL-1 β -Freisetzung humaner Immunzellen mit der HDAC6-Aktivität in Verbindung steht, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung eines HDAC6-Mangels auf die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung untersucht. Um einen HDAC6-Mangel zu erzeugen, wurde das PROTAC LS-91 benutzt, welches HDAC6 gezielt abbaut.

3.3.1 PROTAC LS-91 führt zum Abbau von HDAC6 in Makrophagen, ohne die Viabilität zu beeinträchtigen

Um den optimalen Zeitpunkt für die HDAC6-Degradierung zu bestimmen, wurden THP-1 Makrophagen mit 1 und 10 μ M des PROTACs LS-91 inkubiert und nach 1, 4, 12 und 24 Stunden die HDAC6-Proteinlevel in den Zellysaten mittels Western Blot Analytik bestimmt (Abbildung 3.37). Die Inkubation mit 1 μ M LS-91 führten zu einer sichtbaren Reduktion des HDAC6-Proteingehalts nach 12 und 24 Stunden, allerdings war dieser nicht signifikant. Bei einer Konzentration von 10 μ M wurde ein signifikanter Abbau von HDAC6 bereits nach einer Stunde sichtbar. Erhöhte sich die Inkubationszeit auf 4 Stunden, war der HDAC6-Abbau dagegen nicht mehr so stark ausgeprägt. Nach 12 Stunden erreichte LS-91 den maximalen Abbau von HDAC6. Der HDAC6-Abbau war zwar auf Grund der höheren Streuung nach 24-stündiger Inkubationszeit mit LS-91 nicht signifikant, LS-91 konnte die HDAC6-Proteinlevel im Western Blot dennoch sichtbar reduziert. Da anschließende NLRP3-Aktivierungsstudien eine zusätzliche sechsstündige Inkubation mit anderen Stimulanzen erforderten, wurde für die

Konzentrations-Wirkungsstudien aus organisatorischen Gründen eine 24-stündige Inkubation mit LS-91 gewählt.

A



B

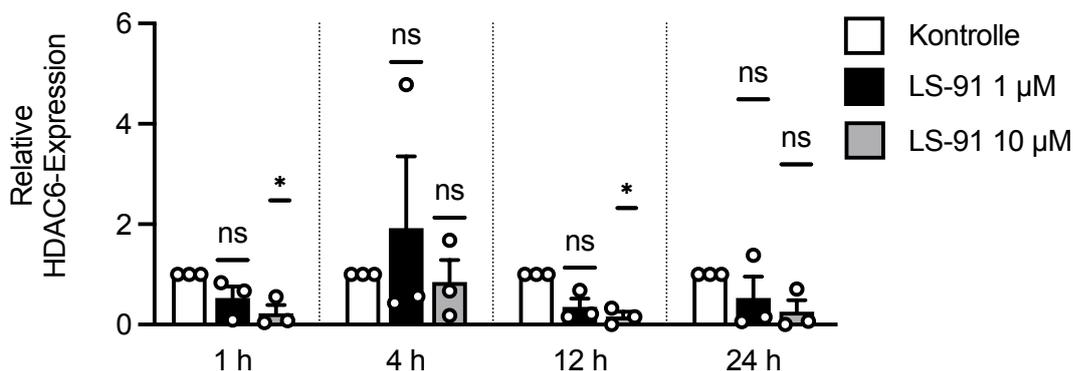


Abbildung 3.37: Zeitabhängiger HDAC6-Abbau durch LS-91. THP-1 Makrophagen wurden 1, 4, 12 oder 24 Stunde/n mit oder ohne LS-91 (1 und 10 µM) inkubiert. Der HDAC6-Proteingehalt aus den Zelllysaten wurde mittels Western Blot Analytik in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt und auf die jeweilige Gesamtproteinmenge normalisiert. Die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns ≥ 0.05, Einstichproben-t-Test gegen 1. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

Um die Konzentrationsabhängigkeit der HDAC6-Degradierung durch LS-91 zu bestimmen, wurden THP-1 Makrophagen für 24 Stunden mit Konzentrationen zwischen 0,01 und 50 µM des PROTAC LS-91 inkubiert und die HDAC6-Proteinspiegel gemessen (Abbildung 3.38). Zusätzlich wurde die Negativkontrolle SLW118 eingesetzt, die zwar HDAC6 bindet, allerdings wird die Bindung an die E3-

Ligase durch eine Methylierung am Thalidomid verhindert, so dass der Abbau von HDAC6 ausbleibt (205,206). Insgesamt senkte LS-91 die HDAC6-Proteinlevel ab einer Konzentration von 0.1 μM signifikant, während die Expression von HDAC6 unter Verwendung von SLW118 unverändert blieb. Eine maximale HDAC6-Degradierung wurde mit 10 μM LS-91 erreicht. Unter Verwendung von 50 μM LS-91 war der Proteinabbau von HDAC6 dagegen abgeschwächt, was auf den „Hook Effekt“ hindeutet (284,285).

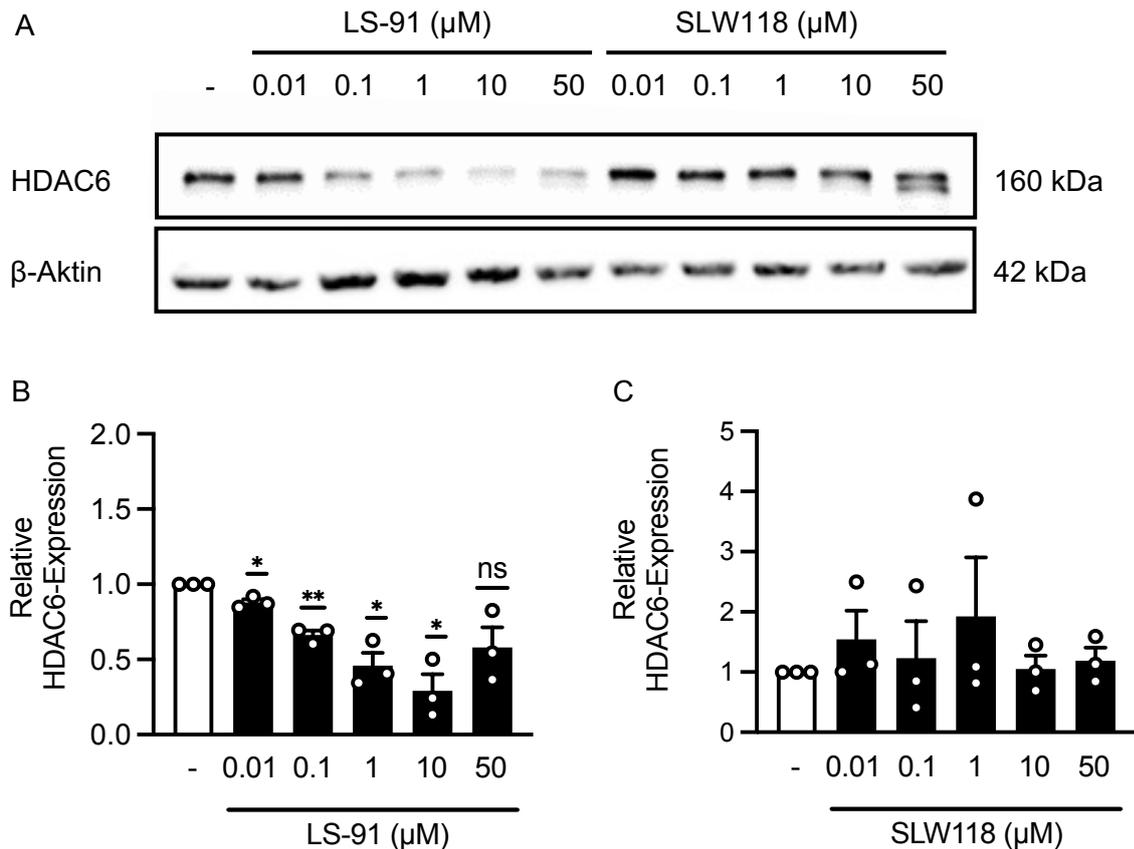
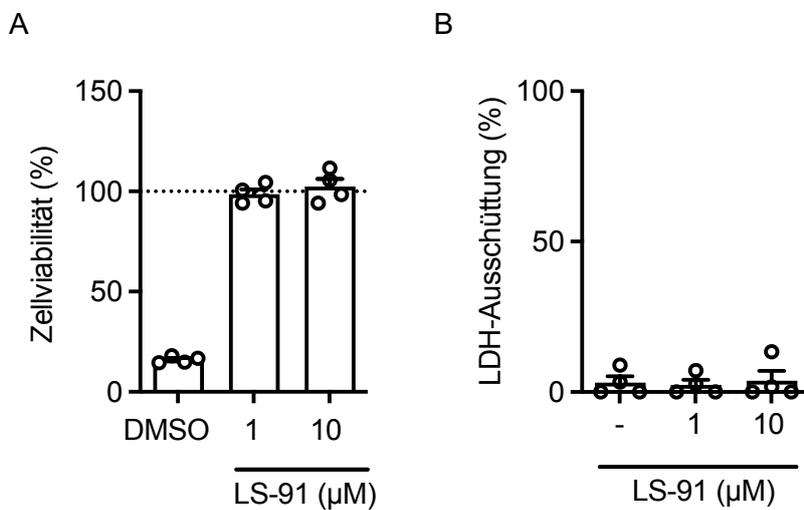


Abbildung 3.38: Konzentrationsabhängiger HDAC6-Abbau nach 24 h Inkubation mit LS-91. THP-1 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit LS-91 oder SLW118 (0.01, 0.1, 1, 10, 50 μM) inkubiert. Die HDAC6- und β -Aktin-Proteingehalte aus den Zelllysaten wurden mittels Western Blot Analytik in 3 unabhängigen Experimenten bestimmt und auf die jeweilige Gesamtproteinmenge normalisiert. β -Aktin diente als visuelle Ladekontrolle. Die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM, ($n = 3$). Statistische Unterschiede: ns ≥ 0.05 , * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$, Einstichproben-t-Test gegen 1. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

Die potenziellen zytotoxischen Wirkungen von LS-91 wurden anhand des MTT-Tests und der LDH-Freisetzung untersucht. Bei einer Konzentration von 1 oder 10 μM verursachte das PROTAC LS-91 weder eine Abnahme der Zellviabilität (Abbildung 3.39 A) noch einen Anstieg der LDH-Freisetzung (Abbildung 3.39 B).

Um toxische Effekte durch das PROTAC LS-91 und die Kontrollsubstanz SLW118 weiter auszuschließen, wurde die Zellviabilität mithilfe einer Annexin V/Zombie Aqua Doppelfärbung im Durchflusszytometer bestimmt. Sowohl PROTAC LS-91 als auch SLW118 zeigten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.39 C), was darauf hindeutet, dass keine der beiden Substanzen Apoptose oder Zelltod auslöste.



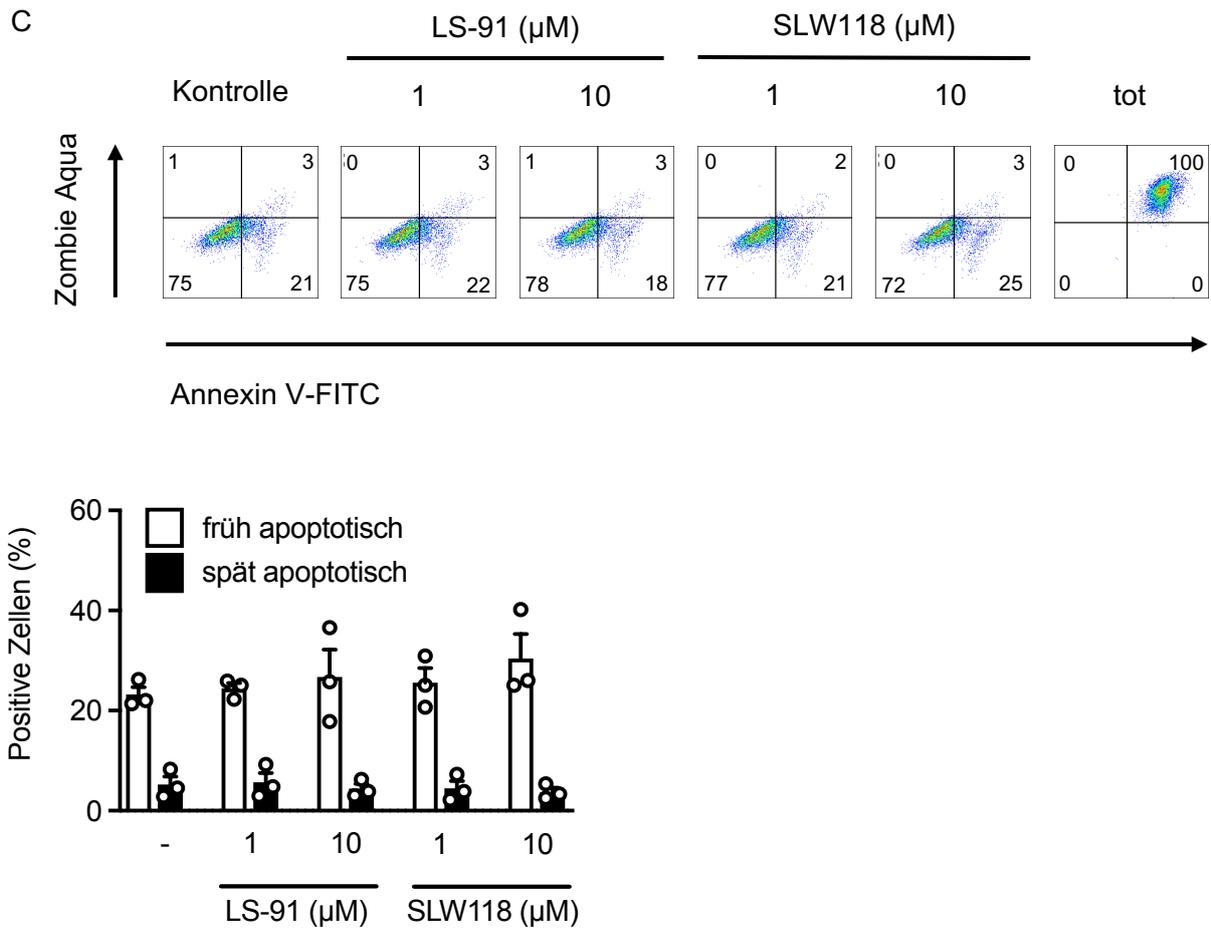


Abbildung 3.39: LS-91 und SLW118 zeigen keine Zytotoxizität. THP-1 Makrophagen wurden (A und B) 12 Stunden oder (C) 24 Stunden mit oder ohne LS-91 (1 und 10 μM) oder SLW118 (1 und 10 μM) inkubiert. (A) Die Zellviabilität wurde mittels des MTT-Tests bestimmt, wobei DMSO (10 % v/v) als Positivkontrolle einsetzte wurde. Die Viabilität wurde auf die unbehandelte Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 100 %). Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 4). (B) Die Zellkulturüberstände wurden auf die LDH-Freisetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in % der maximalen LDH-Freisetzung angegeben. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert + SEM, (n = 4). (C) Die Zellviabilität wurde mittels Annexin V-FITC/Zombie Aqua-Doppelfärbung mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Als Positivkontrolle wurden hitzegetötete Zellen verwendet. Die Daten repräsentieren 3 unabhängige Experimente. Das Balkendiagramm zeigt die Mittelwerte + SEM (n = 3). Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

3.3.2 PROTAC LS-91 und Kontrollsubstanz SLW118 senken die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung

Die ZnF-UBP von HDAC6 ist in Mausmakrophagen beim Aufbau und der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beteiligt (42). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein Abbau von HDAC6 durch das PROTAC LS-91 die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen abschwächen könnte.

Im ersten Schritt konnte bereits gezeigt werden, dass eine 24-stündige Stimulation mit 10 μ M LS-91 zu einer Reduktion von HDAC6 führte. Unter diesen Bedingungen wurde anschließend der Einfluss von LS-91 auf die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung getestet (Abbildung 3.40).

Zunächst wurde jedoch geprüft, ob die Stimulation mit LS-91 oder SLW118 selbst eine Freisetzung von IL-1 β zur Folge hat. Dafür wurden THP-1 Makrophagen 24 Stunden mit dem PROTAC LS-91 oder der Kontrollsubstanz SLW118 inkubiert und anschließend für 3 Stunden mit Pam₃CSK₄ stimuliert (Abbildung 3.41 A). Während der NLRP3-Aktivator Nigericin, wie erwartet, die IL-1 β -Freisetzung in TLR-*geprimten* Makrophagen induzierte, konnten mögliche Effekte durch die Vorinkubation mit LS-91 oder SLW118 wie erwartet ausgeschlossen werden.

Um zu prüfen, ob ein HDAC6-Abbau zu einer reduzierten NLRP3-Inflammasom-Aktivierung in THP-1 Makrophagen führt, wurde die Auswirkung von LS-91 und SLW118 auf die ATP- und Nigericin-vermittelte IL-1 β -Freisetzung untersucht (Abbildung 3.40 B und C). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen eines von Indirubin-abgeleiteten HDAC6-PROTAC (178), senkte LS-91 konzentrationsabhängig die ATP- oder Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abbildung 3.40 B und C). Bei einer Konzentration von 10 μ M reduzierte LS-91 die ATP-induzierten IL-1 β -Spiegel signifikant um 67 % und die Nigericin-induzierten IL-1 β -Spiegel um 50 %. Allerdings reduzierte die Kontrollsubstanz SLW118, die HDAC6 nicht abbaut, die Zytokinspiegel auf ähnliche Weise. Dies deutet darauf hin, dass ein HDAC6-Abbau nicht für die Hemmung der NLRP3-Inflammasom-vermittelten IL-1 β -Freisetzung verantwortlich ist.

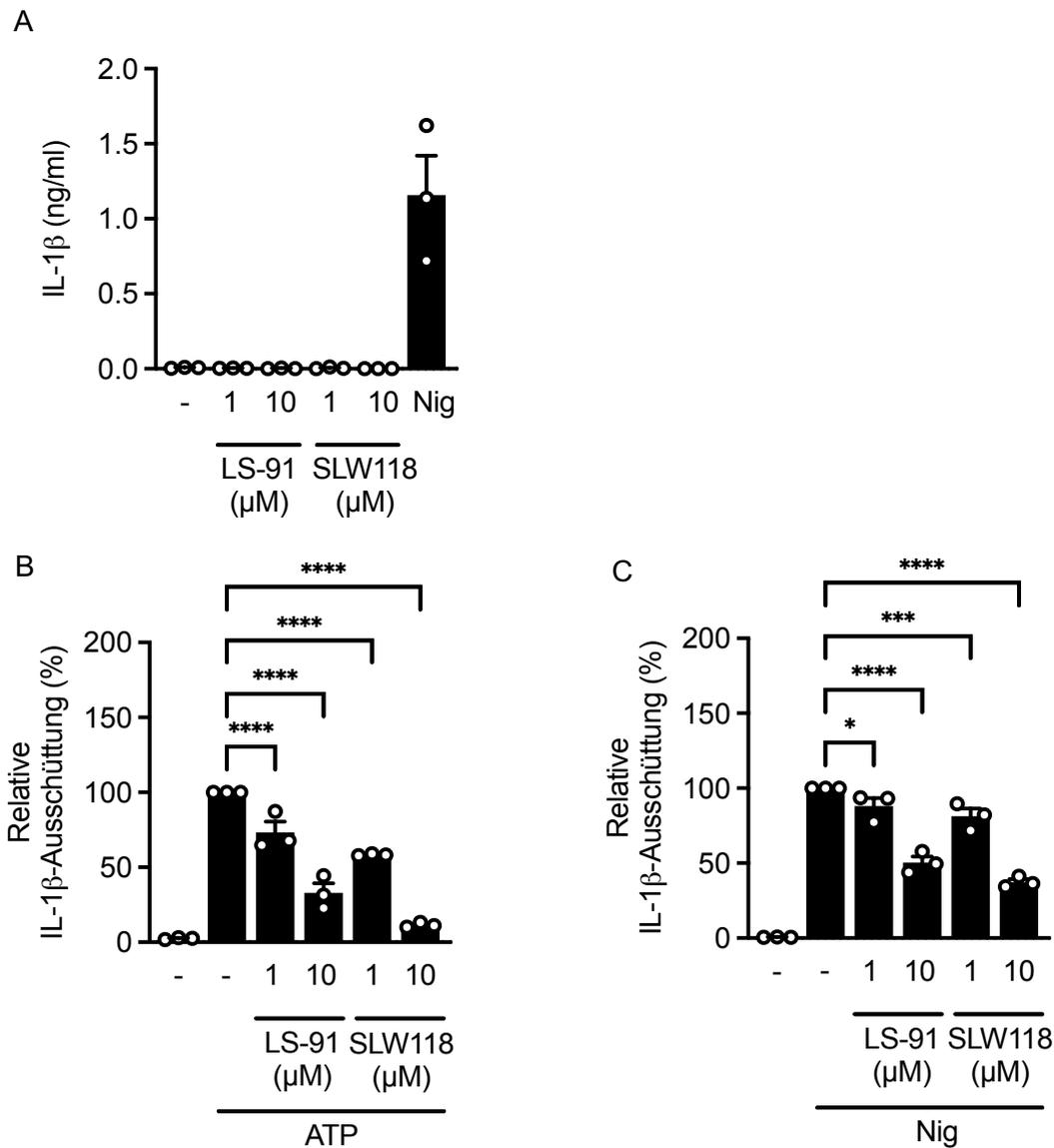


Abbildung 3.40: 24 Stunden Inkubation mit LS-91 senkt die ATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Sekretion. THP-1 Makrophagen wurden 24 Stunden mit oder ohne LS-91 oder SLW118 (1 oder 10 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 Stunden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) stimuliert. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Als Positivkontrolle dienten THP-1 Makrophagen, die nach der Inkubation mit Pam₃CSK₄ weitere 3 Stunden mit Nigericin (10 μ M) stimuliert wurden. (B und C) THP-1 Makrophagen wurden 24 Stunden mit oder ohne LS-91 oder SLW118 (1 oder 10 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann ohne, (B) mit ATP (2 mM) oder (C) mit Nigericin (10 μ M) stimuliert. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die ATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0,05, *P \leq 0,05, **P \leq 0,01, ***P \leq 0,001, ****P \leq 0,0001, einfaktorielles Varianzanalyse gefolgt von Dunnett. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

Es wurde bereits gezeigt, dass ein HDAC6-Mangel keinen Einfluss auf das TLR-vermittelte *Priming* hat (42,183), die für die ATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung erforderlich ist (14,27). Allerdings können immunmodulatorische IMiDs (*immunomodulatory imide drugs*) wie Thalidomid selbst die TLR-Antworten beeinflussen (286). Da Thalidomid Bestandteil von LS-91 ist, wurde deshalb untersucht, ob die gesenkte NLRP3-Inflammasom-Aktivierung durch LS-91 und SLW118 auf deren Beeinflussung des TLR2/1-Signalwegs zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurden die zwei Endpunkte *IL1B* mRNA-Expression und TNF-Ausschüttung, die für eine TLR2/1-Signalwegaktivierung charakteristisch sind, untersucht. Die Inkubation mit LS-91 in einer Konzentration von 10 μ M führte zu einer leichten, aber nicht signifikanten Senkung der durch den TLR2/1-Liganden Pam₃CSK₄-vermittelten *IL1B* mRNA-Expression (Abbildung 3.41 A). Wurden die Effekte von LS-91 und SLW118 auf Proteinebene untersucht, konnte jedoch eine signifikante Senkung der Pam₃CSK₄-induzierten TNF-Freisetzung auf 52,9 bzw. 59,2 % gezeigt werden (Abbildung 3.41 B).

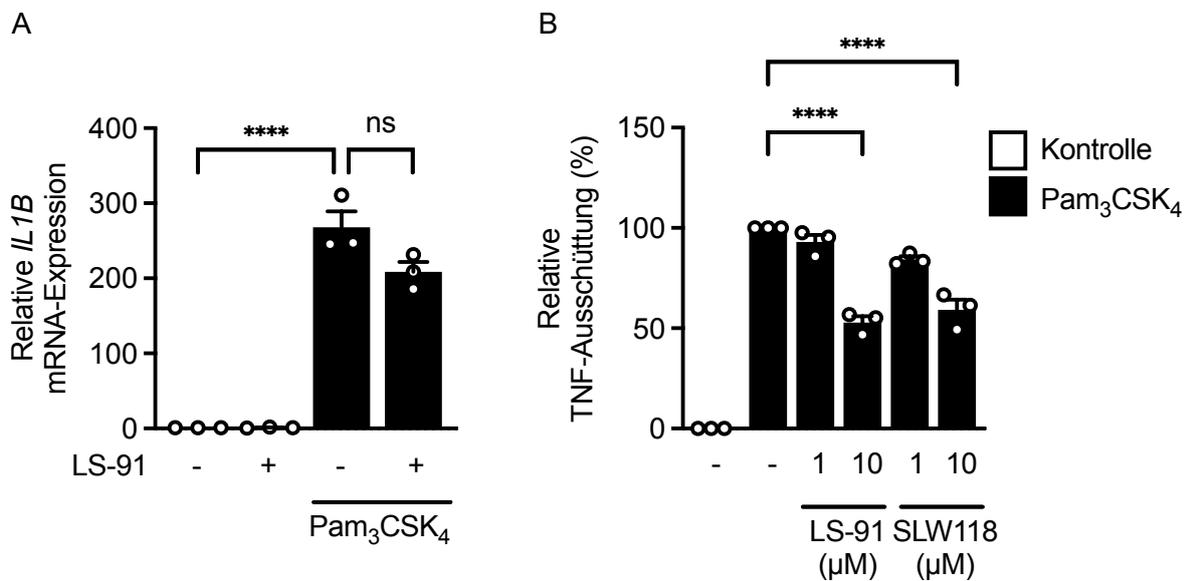


Abbildung 3.41: Der Einfluss von LS-91 und SLW118 auf das Pam₃CSK₄-vermittelte *Priming*. THP-1 Makrophagen wurden 24 Stunden mit oder ohne LS-91 oder SLW118 (1 oder 10 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 Stunden mit oder ohne Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) stimuliert. (A) Die Genexpression von *IL1B* wurde auf das Haushaltsgen *GAPDH* normalisiert und die jeweiligen Werte wurden auf die Kontrolle bezogen (Kontrolle bezeichnet mit dem Wert 1). Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0,05, ****P \leq 0,0001, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Bonferroni. (B) Die TNF-Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ****P \leq 0,0001, einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Dunnett. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

3.3.3 HDAC-Inhibitoren reduzieren die Freisetzung von IL-1 β

Obwohl die ZnF-UBP-Domäne von HDAC6 maßgeblich an der Regulation des NLRP3-Inflammasoms in Mauszellen beteiligt ist (42), war ein HDAC6-Abbau in THP-1 Makrophagen nicht ausschlaggebend für die verminderte NLRP3-Inflammasom-Aktivierung (Abbildung 3.40). Sowohl das PROTAC LS-91, das einen HDAC6-Abbau induzierte, als auch die Kontrollsubstanz SLW118, die die HDAC6-Proteinlevel nicht beeinflusst, hatten eine Senkung der NLRP3-vermittelten IL-1 β -Freisetzung zur Folge. Die Reduktion der IL-1 β -Spiegel entsprach dabei einem ähnlichen Niveau wie die Reduktion der Pam₃CSK₄-vermittelten TNF-Produktion durch LS-91 und SLW118. Deswegen wurde vermutet, dass eine gemeinsame strukturelle Komponente von LS-91 und SLW118 für das beeinflusste TLR2/1-vermittelte *Priming* durch Pam₃CSK₄ und die damit reduzierte IL-1 β -Freisetzung verantwortlich ist.

Da das PROTAC LS-91 als auch SLW118 aus 2 funktionellen Molekülen bestehen, sollte nun untersucht werden, ob und welcher der einzelnen Bauteile eine NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung zur Folge haben könnte.

LS-91 und SLW118 bestehen beide aus der HDAC6-bindenden Komponente SAHA und unterscheiden sich darin, dass LS-91 Thalidomid und SLW118 ein am Glutarimidring methyliertes Thalidomid (SLW120) enthalten. Um den Einfluss aller Einzelkomponenten auf die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung zu untersuchen, wurden THP-1 Makrophagen mit dem pan-HDAC-Inhibitor SAHA, Thalidomid oder SLW 120 vorinkubiert. Zusätzlich wurde der spezifische HDAC6-Inhibitor Tubastatin A verwendet. Anschließend wurde die Veränderung der ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung gemessen. Während eine 24-stündige Vorinkubation mit dem HDAC6-Inhibitor Tubastatin A die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung auf 22,1 % reduzierte, konnte der pan-HDAC-Inhibitor SAHA diese sogar vollständig unterdrücken (Abbildung 3.42 A). Thalidomid und SLW120 hatten ebenfalls eine leichte Senkung der ATP-vermittelten IL-1 β -Freisetzung auf 64,5 % bzw. 69,1 % zur Folge, obgleich die Senkung weniger stark ausgeprägt war, wie die Senkung durch die HDAC-Inhibitoren. Da alle verwendeten Einzelkomponenten keinen Anstieg der LDH-Freisetzung gegenüber der unbehandelten Kontrolle zur Folge hatten (Abbildung 3.42 B), konnten potenziell zytotoxische Effekte ausgeschlossen werden.

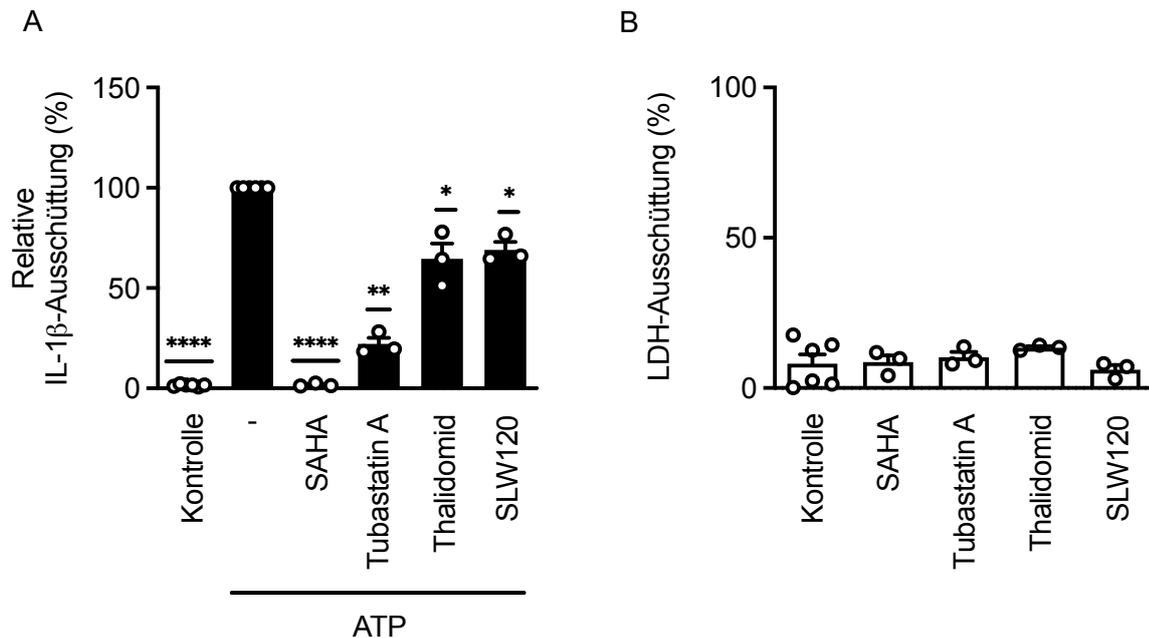


Abbildung 3.42: Einfluss der Einzelkomponenten von PROTAC LS-91 und SLW118 auf die ATP-induzierte IL-1 β -Ausschüttung. THP-1 Makrophagen wurden 24 Stunden mit SAHA (10 μ M), Tubastatin A (10 μ M), Thalidomid (10 μ M) oder SLW120 (10 μ M) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und mit ATP (2 mM) stimuliert. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung wurde auf 100 % gesetzt. (B) THP-1 Makrophagen wurden 24 Stunden mit SAHA (10 μ M), Tubastatin A (10 μ M), Thalidomid (10 μ M) oder SLW120 (10 μ M) inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden auf die LDH-Freisetzung untersucht. Die Ergebnisse sind in % der maximalen LDH-Freisetzung angegeben. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, ***P \leq 0.001, ****P \leq 0.0001, Einstichproben-t-Test gegen 100 %. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibierung der katalytischen Domäne von HDAC6 für die gesenkte NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen ausreichend ist. Da ausgeschlossen werden sollte, dass HDAC6-Inhibitoren die IL-1 β -Freisetzung reduzieren, indem sie das TLR2/1-vermittelte *Priming* beeinflussen, wurde der Effekt auf die ATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch die Zugabe von Tubastatin A nach dem *Priming* durch Pam₃CSK₄ untersucht (Abbildung 3.43). HDAC6-Inhibitoren unterdrücken die Enzymaktivität schneller, als der HDAC6-Abbau durch PROTACs erreicht wird (174,178,287). Durch kinetische Messungen, konnte bereits gezeigt werden, dass eine Acetylierung von α -Tubulin durch HDAC-Inhibitoren bereits nach einer Stunde ihren maximalen Wert erreicht (174). Daher lässt sich darauf schließen, dass keine 24-stündige Inkubation erforderlich ist, um die katalytische Domäne zu hemmen. Deswegen wurde eine kürzere

Inkubationsdauer getestet. Wurde Tubastatin A nach dem *Priming* mit Pam₃CSK₄ hinzugefügt, konnte die ATP- und Nigericin-vermittelte IL-1 β -Freisetzung nicht signifikant gesenkt werden.

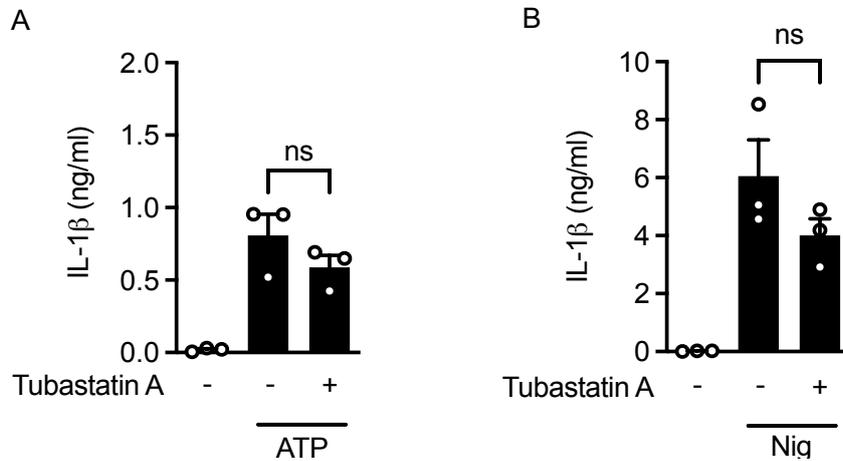


Abbildung 3.43: Eine Stunde Inkubation mit Tubastatin A senkt die ATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Ausschüttung nicht. THP-1 Makrophagen wurden mit Pam₃CSK₄ (1 μ g/ml) *geprimt* und dann 3 Stunden mit ATP (2 mM) oder Nigericin (10 μ M) stimuliert. Der HDAC6-Inhibitor (Tubastatin A, 10 μ M) wurde eine Stunde vor der Stimulation zugegeben. Die IL-1 β -Freisetzung in den Zellkulturüberständen wurde mittels ELISA bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte + SEM, (n = 3). Statistische Unterschiede: ns \geq 0.05, einfaktorielles Varianzanalyse gefolgt von Dunnett. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

4. Diskussion

4.1 Die THP-1 und U937 Zelllinie als Modell für Untersuchungen der IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen

Das NLRP3-Inflammasom ist ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunität, welches Entzündungsreaktionen durch die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β steuert. Das Verständnis von Kontrollmechanismen für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und die Freisetzung von IL-1 β ist entscheidend für die Aufklärung der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen, die mit erhöhten IL-1 β -Spiegeln einhergehen. Zur Untersuchung der NLRP3-induzierten IL-1 β -Freisetzung werden meistens Makrophagen, die aus dem Knochenmark von Mäusen stammen (*bone marrow-derived macrophages*, BMDMs), als *in vitro* Modelle verwendet (30). Die Unterschiede in der Physiologie von Menschen und Mäusen erfordern jedoch eine vorsichtige Interpretation der Ergebnisse aus Mausmodellen. So ist bereits klar, dass sich die Immunantworten zwischen diesen Spezies unterscheiden (288) und beispielsweise humane, nicht aber murine Monozyten auf LPS mit einer Freisetzung von IL-1 β reagierten (289). In humanen Monozyten aktivierte LPS das NLRP3-Inflammasom über einen alternativen Signalweg, der im Gegensatz zur klassischen NLRP3-Signalisierung unabhängig vom K⁺-Efflux und Pyroptose war. Dieser alternative Inflammasom-Weg in Menschen könnte zumindest teilweise dafür verantwortlich sein, dass Menschen weitaus anfälliger dafür sind, an einer Endotoxinämie zu sterben als Mäuse (290) und hebt die artspezifischen Unterschiede bei der IL-1 β -Freisetzung hervor. Um die IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit die humanen THP-1 und U937 Zelllinien als *in vitro* Modelle verwendet. Während THP-1 Zellen aus dem Blut eines einjährigen, männlichen Patienten mit akuter monozytärer Leukämie stammen (291), wurden die U937 Zellen aus dem histiozytischen Lymphom eines 37-jährigen männlichen Patienten isoliert (211). Ihr humaner Ursprung ermöglicht die Untersuchung humanspezifischer Immunreaktionen und bietet direkte Einblicke in die molekularen Wege, die Entzündungsprozesse beim Menschen steuern. Beide Zelllinien lassen sich relativ einfach kultivieren und mittels PMA zu makrophagenartigen Zellen ausdifferenzieren, der primäre humane Makrophagen in mehrfacher Hinsicht nachahmt (212,292–294). Während die Differenzierungsmethode für THP-1 Zellen in der Arbeitsgruppe bereits erprobt war, wurde im Rahmen der Untersuchungen eine Methode für die Differenzierung von U937 Makrophagen etabliert. Eine Behandlung der Zellen mit 50 ng/ml PMA über 72 Stunden, gefolgt von einer Ruhephase von 24 Stunden, führte zu einer Steigerung der für Makrophagen charakteristischen Zelloberflächenmarker und resultierte in einer üblichen Zellmorphologie und einer angemessenen Zelladhäsion (264,265,272,274–276). U937 Makrophagen reagierten auf LPS im Gegensatz zu den promonozytären U937 Zellen mit einer gesteigerten TNF-Freisetzung, was mit der Literatur einhergeht (295,296).

Aufgrund der einfachen Kultivierung und Möglichkeit zur Differenzierung zu Makrophagen, werden THP-1 und U937 Zellen häufig als Modelle verwendet, um die Immunreaktion in humanen Makrophagen

zu erforschen und Probleme der begrenzten Lebensdauer von Monozyten abstammenden humanen Makrophagen (*monocyte derived macrophages*, MDMs) zu überwinden (211,213,214). Bereits in der Vergangenheit wurden sowohl THP-1 als auch U937 Makrophagen für Studien des NLRP3-Inflammasoms eingesetzt (22,297). Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass sich PMA-Konzentrationen und Stimulationszeiten in der Literatur unterscheiden, was einen entscheidenden Einfluss auf die Versuchsergebnisse haben kann. So könnte eine künstliche Differenzierung mit PMA phänotypische Variationen bedingen, die den Phänotyp der primären Makrophagen, die im Gewebe vorkommen, möglicherweise nicht vollständig nachbilden. Des Weiteren bilden Zelllinien nicht die komplexen Zellinteraktionen in einem Gewebe nach. Die Interaktion von Zellen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems kann am Ende ausschlaggebend für eine adäquate Immunantwort sein (298). Die Vergleichbarkeit von Zelllinien und die Übertragbarkeit auf *in vivo* Modelle und auf das tatsächliche Geschehen im humanen Organismus sollte daher stets kritisch hinterfragt werden. In Bezug auf die IL-1 β -Freisetzung reagierten THP-1 Monozyten auf alle getesteten Stimuli ähnlich wie die aus dem Buffy Coat isolierten PBMCs. Daher wurde angenommen, dass die IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen auch vergleichbar mit MDMs ist. Um die Ergebnisse, die in THP-1 und U937 Makrophagen generiert wurden zu bekräftigen, wäre es dennoch sinnvoll, Versuche ebenfalls in MDMs durchzuführen.

4.2 Die IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen kann NLRP3-unabhängig erfolgen

4.2.1 P2X7-Rezeptorstimulation führt zur NLRP3-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen

Der purinerge Rezeptor P2X7 spielt eine entscheidende Rolle bei Infektionen, Entzündungen und Zelltod. Der nichtselektive Ionenkanal wird durch den endogenen Liganden ATP und dessen Derivat BzATP aktiviert. Eine seiner wichtigsten Funktionen ist die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms, welches in Folge für die Verarbeitung und Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β verantwortlich ist (299). Es konnte gezeigt werden, dass eine 3-stündige Behandlung von TLR-*geprimten* THP-1 Makrophagen mit ATP und BzATP eine Freisetzung von IL-1 β induzierte (Abbildung 3.3). Ähnliche Ergebnisse wurden für ATP bei kinetischen Messungen der IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen erzielt (300). Es wird angenommen, dass das NLRP3-Inflammasom maßgeblich am Prozess der IL-1 β -Freisetzung beteiligt ist. Obwohl meine Ergebnisse die Bedeutung des P2X7-Rezeptors bei IL-1 β -bedingten Entzündungen unterstützen (70), konnte festgestellt werden, dass die über den P2X7-Rezeptor-vermittelte IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen über einen NLRP3-unabhängigen Weg stattfindet. Dieser bisher unbekannt Mechanismus unterstreicht die Bedeutung der

Hemmung des P2X7-Rezeptors bei entzündlichen Erkrankungen (301–303) und hebt die artspezifischen Unterschiede bei der IL-1 β -Freisetzung zwischen murinen und humanen Makrophagen hervor.

Meine Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation humaner Makrophagen mit dem P2X7-Rezeptorliganden ATP zu einer NLRP3-Inflammasom-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung führte (Abbildungen 3.6 und 3.35). Die NLRP3 Inhibitoren MCC950 und Bay 11.7082 senkten die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nur teilweise. Außerdem führte die Stimulation mit ATP in Pam₃CSK₄-geprägten humanen Makrophagen, denen NLRP3 fehlt, zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung. Diese Effekte waren bei BzATP, einem synthetischen ATP-Derivat und potenteren P2X7-Rezeptorliganden, noch stärker ausgeprägt (80). Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen überein, die in humanen Makrophagen erzielt wurden. So konnte gezeigt werden, dass der NLRP3-Inhibitor MCC950 die IL-1 β -Freisetzung durch ATP in humanen Makrophagen nur teilweise hemmte (256). Im Gegensatz dazu war die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung in Mausmakrophagen vollständig NLRP3-abhängig (256,304,305). Die artspezifischen Unterschiede der NLRP3-Abhängigkeit zeigen sich besonders in Hinblick auf die P2X7-vermittelte IL-1 β -Freisetzung. Die Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung, die unabhängig vom P2X7-Rezeptor erfolgt, zeigte in humanen Makrophagen eine vollständig NLRP3-Abhängigkeit, was mit den Ergebnissen in Mausmakrophagen vergleichbar ist (30).

Obwohl bisher angenommen wurde, dass der P2X7-Rezeptor die IL-1 β -Freisetzung NLRP3-abhängig vermittelt (70), zeigen Ergebnisse dieser Arbeit, dass die IL-1 β -Freisetzung durch ATP und BzATP in humanen Makrophagen auch ohne die Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms stattfindet. Daher wurde die Rolle des P2X7-Rezeptors auf die IL-1 β -Freisetzung genauer untersucht. PPADS, ein unspezifischer P2-Inhibitor und P2X7-Rezeptor-Antagonisten wie A804598 und oxATP blockierten die durch ATP und BzATP, nicht aber die durch Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung (Abbildung 3.4), was darauf hindeutet, dass die NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung vollständig auf den P2X7-Rezeptor zurückzuführen ist. Experimente in LPS-geprägten Mausmakrophagen, die mit dem selektiven P2X7R-Antagonisten A438079 behandelt wurden, unterstützen den Befund, dass die IL-1 β -Freisetzung durch BzATP vollständig P2X7-Rezeptor-abhängig ist (306). Um die Ergebnisse, die durch die verschiedenen P2X-Rezeptor-Inhibitoren gewonnen wurden zu bestätigen, wäre die Verwendung von P2X7-Knockout-Zellen interessant.

4.2.2 Ap₄ induziert die Freisetzung von IL-1 β in humanen Makrophagen

Ap₄ ist ein natürlich vorkommendes Nukleotid, das unter anderem vasokonstriktorische Effekte vermittelt (93,97). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die Beteiligung von Ap₄ an Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass Ap₄ in *geprägten*-PBMCs, THP-1 Monozyten, als auch THP-1 und U937 Makrophagen zur Erhöhung der extrazellulären

IL-1 β Konzentration führte (Abbildungen 3.13, 3.15, 3.16 und 3.34). Andere immunmodulatorischen Effekte (TNF, IL-6, IL-2, IL-12, IL-9, IL-10, IFN- γ , IL-17A, GM-CSF, IFN- α , IL-4 und IL-5, IL-8) wurden allerdings nicht beobachtet (Abbildungen 3.14, 3.17 und 3.34), wodurch das Zytokins IL-1 β eine zentrale Rolle bei der Ap4-vermittelten Entzündungsreaktion übernimmt.

Mehrere Studien konnten bereits nachweisen, dass Ap4 stabiler als ATP ist und unter anderem stärkere vasokonstriktorischen Effekte hat (93,95,107). Jedoch waren die Effekte von Ap4 auf die IL-1 β -Freisetzung gegenüber ATP in *geprimten*-THP-1 Makrophagen schwächer ausgeprägt (Abbildungen 3.3 und 3.16). Im Gegensatz dazu zeigten *geprimte*-U937 Makrophagen eine stärkere Reaktion auf Ap4 als auf ATP (Abbildung 3.34). Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass sich beide Zelllinien in Bezug auf ihren Entwicklungsgrad und ihre Herkunft unterscheiden, was mögliche Variationen in ihrer Reaktion auf Stimuli bedingt. Außerdem kann es an individuellen Unterschieden in der IL-1 β -Freisetzungen der Zelltypen liegen, aber auch an den voneinander abweichenden Differenzierungsbedingungen. Für die Differenzierung der U937 Makrophagen wurden höhere PMA-Konzentrationen und längere Stimulationszeiten verwendet. In der Vergangenheit konnte festgestellt werden, dass THP-1 und U937 Makrophagen sogar unter den gleichen standardisierten PMA-Differenzierungsbedingungen verschiedene Reaktionen auf dieselben Stimuli zeigten (212). In PMA-differenzierten U937 Makrophagen waren bereits basale IL-1 β -Spiegel (ca. 20 pg/ml) nachweisbar, während THP-1 Makrophagen nach Differenzierung ohne weitere Stimulation keine messbaren IL-1 β -Zytokinspiegel freisetzen (212). Dies ist im Einklang mit meinen Ergebnissen und bietet eine Erklärung, warum die Ap4-induzierten IL-1 β -Zytokinspiegel in U937 Makrophagen deutlich höher ausfielen als in THP-1 Makrophagen.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Freisetzung von IL-1 β in Makrophagen eine Membranpermeabilität erfordert (57,307). Ap4 induzierte in THP-1 Makrophagen eine Membranpermeabilität, die anhand des Anstiegs der LDH-Konzentration im Überstand festgestellt wurde (Abbildung 3.16). Da diese jedoch unabhängig vom *Priming* war, kann man darauf schließen, dass die Membranpermeabilität unabhängig vom NLRP3-Inflammasom zu betrachten ist. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde gezeigt, dass das 2. Signal der NLRP3-Inflammasom-Aktivierung ein zytotoxisches Signal ist und die Freisetzung von IL-1 β erleichtert (308).

Da Ap4 unter anderem bereits im Nebennierenmark und Plasma nachgewiesen werden konnte (93,97), ist es möglich, dass Ap4 an IL-1 β -vermittelten Entzündungen beteiligt ist, die Arteriosklerose fördern könnten (118). Da Arteriosklerose eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie von Herz-Kreislaufkrankungen spielt, ist die Erforschung der Ap4-vermittelten IL-1 β -Freisetzung von großer Bedeutung, um potenziell neue Therapieoptionen zu identifizieren. Daher wurde der Mechanismus der IL-1 β -Freisetzung in dieser Arbeit weiter analysiert.

4.2.2.1 Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist NLRP3-unabhängig

Die Ergebnisse zeigen, dass die Ap4-vermittelte, ebenso wie die BzATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen unabhängig vom NLRP3-Inflammasom stattfindet. Die Annahme stützt sich auf die Ergebnisse von Versuchen mit NLRP3-Inhibitoren und NLRP3-Knockout-Makrophagen (Abbildungen 3.28 und 3.35). In Anwesenheit der NLRP3 Inhibitoren MCC950 und Bay 11.7082 blieb die IL-1 β -Freisetzung durch Ap4 in THP-1 Makrophagen unverändert. In Pam₃CSK₄-geprimten humanen Makrophagen, denen NLRP3 fehlte, führte die Stimulation mit Ap4 außerdem zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Freisetzung. Die Ergebnisse werden weiter durch Experimente in U937 Makrophagen gestützt. In U937 Makrophagen hatte MCC950 ebenfalls keinen Effekt auf die Ap4-vermittelte IL-1 β -Freisetzung, wohingegen die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung teilweise reduziert werden konnte (Abbildung 3.35). Um die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung abzuschwächen, waren in U937 Makrophagen höhere Konzentrationen von MCC950 erforderlich als in THP-1 Makrophagen. Die Verwendung der eingesetzten Konzentrationen ist jedoch nicht ungewöhnlich. In Studien zur NLRP3-Abhängigkeit in THP-1 Makrophagen und BMDMs werden üblicherweise Konzentrationen von 1 bis 10 μ M MCC950 verwendet (256,309–311). Für Untersuchungen in U937 Makrophagen wurden jedoch bereits in der Vergangenheit höhere Konzentrationen von MCC950 eingesetzt (312). Da sich die beiden Zelllinien in Herkunft, Reifestadium und Differenzierungsmethode unterscheiden, könnten individuelle Unterschiede im NLRP3-Signalweg zwischen den beiden Zelltypen möglicherweise der Grund dafür sein.

4.2.3 Einfluss des K⁺-Efflux auf die IL-1 β -Freisetzung

Ein allgemein bekannter Mechanismus, der zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms beiträgt, ist der K⁺-Efflux durch die Plasmamembran (30,32,313). Deshalb wird im Zusammenhang mit Untersuchungen zum NLRP3-Inflammasom häufig auch die Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung vom K⁺-Efflux untersucht (32,314,315). In Übereinstimmung mit bereits publizierten Ergebnissen (32,289), wurde die NLRP3-abhängige IL-1 β -Freisetzung durch Nigericin vollständig blockiert, wenn der K⁺-Efflux inhibiert wurde (Abbildung 3.5). Während eine Hemmung des K⁺-Effluxes die IL-1 β -Freisetzung durch ATP in Mausmakrophagen ebenfalls komplett inhibierte (32,316), war in humanen Makrophagen ein Teil der P2X7-vermittelten IL-1 β -Freisetzung unabhängig vom K⁺-Efflux (Abbildung 3.5), was zeigt, dass sich die IL-1 β Signalgebung in murinen und humanen Makrophagen unterscheidet. Im Gegensatz zu ATP aktivierte Ap4 in THP-1 Makrophagen eine Signalkaskade, die eine IL-1 β -Freisetzung zur Folge hat, die vollständig unabhängig vom K⁺-Ausstrom war (Abbildung 3.27).

Es bleibt dennoch zu beachten, dass in der Vergangenheit bereits Kalium-unabhängige Mechanismen zur IL-1 β -Freisetzung beschrieben worden sind (289,316). Diese beinhalten jedoch eine NLRP3-

Aktivierung. So löst Imiquimod, ein Arzneistoff, der für die Behandlung von Virusinfektionen und Hautkrebs zugelassen ist, eine NLRP3-Aktivierung in dendritischen Zellen aus, die unabhängig vom K^+ -Efflux ist (314). In Mausmakrophagen konnte eine Erhöhung der extrazellulären Kaliumkonzentration, die durch ADP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung nicht verhindern (316). Obwohl Ergebnisse der Studie darauf schließen lassen, dass ADP unabhängig vom K^+ -Efflux zur IL-1 β -Freisetzung führt, war zumindest das NLRP3-Inflammasom maßgeblich an der IL-1 β -Freisetzung beteiligt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen sowohl unabhängig vom K^+ -Ausstrom als auch unabhängig vom NLRP3-Inflammasom ist. Dies lässt vermuten, dass es in humanen Makrophagen möglicherweise einen alternativen, NLRP3-unabhängigen Mechanismus für die Freisetzung von IL-1 β gibt. Da auch eine P2X7-Rezeptoraktivierung zu einer NLRP3-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung führte, wurde in der Arbeit analysiert, ob Ap4 die NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung ebenfalls über den P2X7-Rezeptor vermittelt.

4.2.4 Beteiligung verschiedener Rezeptoren an der Ap4-vermittelten Reaktion

4.2.4.1 Die NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung durch Ap4 ist unabhängig vom P2X7-Rezeptor

Die Ergebnisse zeigen, dass die Unabhängigkeit des NLRP3-Inflammasoms bei der Ap4-induzierten IL-1 β -Freisetzung trotz struktureller Ähnlichkeiten zu dem P2X7-Rezeptorliganden ATP nicht auf den P2X7-Rezeptor zurückzuführen sind (Abbildungen 3.4 und 3.18). In humanen Makrophagen wurde die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β durch den P2X7-Rezeptorantagonisten A804598 gehemmt (Abbildung 3.4). Frühere Studien in Mausmakrophagen stellten die Abhängigkeit des P2X7-Rezeptors an der ATP-induzierten Freisetzung bereits fest (306). Im Gegensatz dazu, hatte A804598 keinen Effekt auf die IL-1 β -Freisetzung durch Ap4 (Abbildung 3.18). OxATP hingegen reduzierte neben dem ATP- auch den Ap4-vermittelten Anstieg von IL-1 β . Obwohl oxATP als irreversibler P2X7-Rezeptorantagonist bekannt ist (249), gibt es Studien, die zeigen, dass oxATP im Gegensatz zu A804598, auch mit anderen P2X-Rezeptoren interagieren kann, wie P2X1 und P2X2 (317,318). Da der unspezifische P2-Inhibitor PPADS, der auch P2X7-Rezeptoren hemmt (80), keine Reduktion der Ap4-vermittelten IL-1 β -Freisetzung zeigte (Abbildung 3.18), kann dieser Effekt allerdings vernachlässigt werden. Vielmehr scheint oxATP auch selbst entzündungshemmende Wirkungen auszuüben und die Immunantwort unabhängig von einer P2X7-Blockade zu modulieren (317–319). Um die Abhängigkeit der Ap4-vermittelten IL-1 β -Freisetzung von P2X7-Rezeptoren weiter zu untersuchen, könnte die Verwendung von P2X7-Knockout-Zellen eine wertvolle Methode sein, um weitere Erkenntnisse zu gewinnen.

4.2.4.2 P2X4 Rezeptoren sind nicht an der Ap4-induzierten IL-1 β -Freisetzung beteiligt

Unter den purinergen Rezeptoren ist hauptsächlich der P2X7-Rezeptor an der Freisetzung von IL-1 β beteiligt. Jedoch gibt es Hinweise, dass auch der P2X4-Rezeptor eine Rolle spielt. Eine Studie zeigte, dass P2X4-Knockout-Mäuse eine verminderte Inflammation aufwiesen, was zu einem Rückgang des extrazellulären IL-1 β nach einer Rückenmarksverletzung führte (250). Tatsächlich wurde der P2X4-Rezeptor auch in dendritischen Zellen und Epithelzellen mit der Freisetzung der ATP-induzierten IL-1 β in Verbindung gebracht (320,321). In humanen Makrophagen allerdings konnte der P2X4-Rezeptor den Anstieg von IL-1 β durch ATP nicht modulieren (Abbildung 3.4), was mit Ergebnissen, die in Mausmakrophagen mit einem P2X4-Mangel generiert wurden, einhergeht (306,322). Ap4 aktiviert nachweislich P2X4-Rezeptoren (113). In-THP-1 Makrophagen konnte durch den Einsatz des P2X4-Rezeptorantagonisten 5-BDBD allerdings keine Reduktion der Ap4-induzierten IL-1 β -Spiegel festgestellt werden (Abbildung 3.18). Somit ist die Ap4-vermittelte IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen, ebenso wie die ATP-vermittelte IL-1 β -Freisetzung unabhängig vom P2X4-Rezeptor ist.

4.2.4.3 Der Ap4-induzierte Calciumeinstrom ist abhängig von P2Y-Rezeptoren und unabhängig von P2X7-Rezeptoren

Meine Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ap4-vermittelte IL-1 β -Freisetzung unabhängig von P2X7- und P2X4-Rezeptoren ist. Um die Wirkung von Ap4 direkt am Rezeptor zu untersuchen und unabhängig von der IL-1 β -Freisetzung zu betrachten, wurde daher ebenfalls der Einfluss von Ap4 auf den Calciumeinstrom getestet.

Obwohl es millimolare Konzentrationen an extrazellulärem ATP erfordert, um die Freisetzung von IL-1 β in Makrophagen zu induzieren (300), reichen geringe ATP-Konzentrationen von 100 μ M aus, um einen Calciumeinstrom zu induzieren (260). Ebenso führten geringe Ap4-Konzentrationen (100 μ M) in Synaptosomen des Mittelhirns von Ratten zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der abhängig von extrazellulären Calciumspiegeln war (114). Um zu untersuchen, ob sich diese Erkenntnisse auf THP-1 Zellen übertragen lässt, wurde der Calciumeinstrom durch ATP und Ap4 in THP-1 Zellen untersucht. Im Zuge dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass diese niedrigen Konzentrationen von ATP und Ap4 ausreichen, um in THP-1 Zellen einen Calciumeinstrom zu induzieren (Abbildungen 3.19 und 3.20). Allerdings war der Ap4-vermittelte Calciumeinstrom in THP-1 Makrophagen im Vergleich zu ATP nur sehr gering. Wurden THP-1 Monozyten mit Ap4 und ATP behandelt, zeigte sich, dass die Stimulation mit Ap4 und ATP in THP-1 Monozyten zu einem stärkeren Calciumeinstrom führte als in THP-1 Makrophagen, wobei dieser Effekt durch Stimulation mit Ap4 noch stärker ausgeprägt war. Das unterschiedliche Ansprechen von THP-1 Monozyten und Makrophagen auf ATP konnte bereits früher gezeigt werden (260). Die zugrunde liegenden Faktoren für diese Unterschiede

in der Höhe des Calciumeinstroms wurden nicht weiter untersucht. Jedoch wurde vermutet, dass die Unterschiedliche Expression von P2Y-Rezeptoren auf der Zelloberfläche der beiden Zelltypen verantwortlich dafür sein könnten (260).

Anders als in THP-1 Makrophagen, war der Calciumeinstrom durch Ap4 in THP-1 Monozyten vergleichbar mit dem durch ATP. Auch frühere Untersuchungen in Synaptosomen des Mittelhirns von Ratten zeigten, dass Ap4 und ATP mit EC50 Werten von 19,4 bzw. 24,6 μM einen vergleichbaren Calciumeinstrom verursachten (93), obgleich die Potenz von Ap4 mit einem EC50 Wert von 4 μM in humanen Makrophagen deutlich geringer war als in Synaptosomen des Mittelhirns von Ratten.

Verschiedene Studien deuten auf die Beteiligung unterschiedlicher ionotroper P2X-Rezeptoren an der Ap4-vermittelten Reaktion hin. So wurde bereits gezeigt, dass Ap4 P2X-Rezeptoren im zentralen Nervensystem aktiviert (93). Diese Schlussfolgerung wird teilweise durch Kreuzdesensibilisierungsstudien gestützt, bei der die Verwendung des P2X-Rezeptorantagonisten $\beta,\gamma\text{-meATP}$ die von Ap4 ausgelöste Reaktion am Auge aufhob (95). Des Weiteren vermittelt Ap4 in glatten Muskelzellen über P2X1-Rezeptoren eine Vasokonstriktion (97) und aktiviert humane P2X4-Rezeptoren (113). Die Studie zeigte, dass eine Ap4-Stimulation von P2X4-transfizierten HEK293 Zellen zu messbaren Ionenströmen führte, die vergleichbar waren mit Ionenströmen durch ATP (113).

Obwohl THP-1 Monozyten P2X-Rezeptoren, wie unter anderem P2X1, P2X4 und P2X7-Rezeptoren exprimieren (260,323–325), verlief der Ap4-vermittelte Calciumeinstrom in THP-1 Monozyten unabhängig von P2X-Rezeptoren (Abbildung 3.21). So zeigen meine Daten, dass die Ap4-vermittelte Calciumantwort in Monozyten durch PPADS nicht reduziert werden konnte, was mit früheren Untersuchungen einhergeht, die zeigen, dass die Zugabe von PPADS keinen Effekt auf Ap4-vermittelte Augeninnendrucksenkung besaß (95). Im Gegensatz dazu verhinderten gleiche Konzentrationen von PPADS die Calciumantwort in Mittelhirnzellen von Ratten (93). Die Tatsache, dass THP-1 Monozyten und Makrophagen unterschiedlich auf Ap4 reagieren, obwohl die P2X-Rezeptorexpression in beiden Zelltypen vergleichbar ist (260), verstärkt die Annahme, dass der Ap4-vermittelte Calciumeinstrom unabhängig von P2X-Rezeptoren verläuft.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass Ap4 in THP-1 Monozyten über Stimulation von GPCRs wirkt, die an $G_{q/11}$ gekoppelt sind, zu denen der P2Y1 Rezeptor, sowie die P2Y-Rezeptoren P2Y2, P2Y4, P2Y6 gehören (261,326,327). Diese Schlussfolgerung wird durch frühere Erkenntnisse gestützt, die zeigen, dass Ap4 über P2Y1-Rezeptoren im Herzen eine Vasodilatation vermittelt (99). Überraschenderweise wurden ähnliche Erkenntnisse mit ATP bereits in der Vergangenheit gewonnen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte, dass THP-1 Makrophagen den P2X7-Rezeptor exprimieren (Abbildung 3.12) und ATP über diesen die IL-1 β -Freisetzung vermittelt (Abbildung 3.4), konnte bereits gezeigt werden, dass der P2X7-Rezeptor keine entscheidende Rolle in Bezug auf das Ausmaß der ATP-induzierten Calciumantwort in THP-1 Monozyten und Makrophagen

hat (260,328–330). Während in Studien mit THP-1 Makrophagen und ausdifferenzierten humanen Makrophagen gezeigt wurde, dass der Hauptteil des Calciumeinstroms, der durch ATP vermittelt wird, durch die Aktivierung von P2Y-Rezeptoren zustande kommt (260,331), war der ATP-vermittelte Calciumeinstrom in THP-1 Monozyten sogar vollständig abhängig von P2Y-Rezeptoren (260). Gegenteilige Effekte wurden in Mausmakrophagen beobachtet, bei denen der P2X7-Rezeptor einen entscheidenden Einfluss auf die ATP-induzierte Calcium-Antwort hatte (330). Dies betont einmal mehr die artspezifischen Unterschiede zwischen Maus und Mensch. Diese Erkenntnisse deuten außerdem darauf hin, dass sich THP-1 Monozyten und Makrophagen nicht als ideales Modell eignen, um anhand des Calciumeinstroms Rückschlüsse auf die Wirkung am P2X7-Rezeptor zu ziehen. Im Gegensatz dazu wurde in früheren Studien gezeigt, dass ATP in transfizierten HEK293 Zellen zu einem Calciumeinstrom führte (332). Dies verdeutlicht, dass sich P2X7-transfizierte HEK293 Zellen besser als Modell zur Untersuchung der P2X7-Rezeptoraktivierung eignen als THP-1 Zellen. Um die Wirkung von Ap4 am P2X7-Rezeptor auszuschließen, wurde daher der Calciumeinstrom und die P2X7-vermittelte Membranporenbildung in P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen untersucht. Während BzATP in transfizierten HEK293 Zellen im Einklang mit früheren Arbeiten zum Calciumeinstrom und zur P2X7-Rezeptor-abhängigen Porenbildung führte (333), zeigte Ap4 keinen der genannten Effekte (Abbildungen 3.24 und 3.25). Obwohl sich durch dieses Ergebnis annehmen lässt, dass Ap4 keine Wirkung am P2X7-Rezeptor vermittelt, reduzierte sich die P2X7-Rezeptor-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch BzATP in Anwesenheit von Ap4 (Abbildung 3.26). Es wird angenommen, dass ATP-Analoga wie BzATP an die ATP-Bindungsstelle am P2X7-Rezeptor binden (334). Daher lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Ap4 zwar möglicherweise mit der ATP-Bindungsstelle am P2X7-Rezeptor interagiert, der Rezeptor allerdings nicht vollständig aktiviert wird, sodass keine P2X7-abhängige Porenbildung und kein Ionenfluss wie Calciumeinstrom und Kaliumausstrom erfolgen. Ebenfalls könnten sterische Hinderung durch Ap4 den Ionenfluss stören. Um diesen Hypothesen nachzugehen, sollten weitere Untersuchungen folgen. So könnte die Bindung von Ap4 am P2X7-Rezeptor durch Radioligandenbindungsstudien oder durch isotherme Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) weiter untersucht werden (335–337).

4.2.4.4 Beteiligung von P2Y-Rezeptoren an der IL-1 β -Freisetzung

Die Hypothese, dass Nukleotide das NLRP3-Inflammasom über andere purinerge Rezeptoren als den P2X7-Rezeptor beeinflussen könnten und so zu einer IL-1 β -Freisetzung führen, wurde bereits zuvor aufgestellt (338). Insbesondere P2Y-Rezeptoren wurden mit der NLRP3-Aktivierung und der IL-1 β -Freisetzung in Verbindung gebracht (315,316,322,339). Eine pharmakologische Hemmung von P2Y1 Rezeptoren reduziert die durch Nanopartikel ausgelöste NLRP3-Aktivierung (339). Außerdem führte

ADP in BMDMs über P2Y1-Rezeptoren zu einer IL-1 β -Freisetzung (316). Dabei war die P2Y1-abhängige IL-1 β -Freisetzung unabhängig vom K⁺-Efflux. Angesichts der Tatsache, dass der Ap4-induzierte Calciumeinstrom in THP-1 Monozyten vollständig G_{q/11}-vermittelt wurde und die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen unabhängig vom K⁺-Efflux erfolgte, sollten infolgedessen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung von P2Y-Rezeptoren bei der Stimulation mit Ap4 zu erforschen. Dafür könnte die IL-1 β -Freisetzung durch Ap4 in Anwesenheit des G_{q/11} Inhibitors YM-254890 oder FR900359 untersucht werden.

4.2.5 Die Verarbeitung von Pro-IL-1 β in aktives IL-1 β

4.2.5.1 Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung von Caspasen

Caspase-1 ist ein zentraler Akteur bei der NLRP3-Inflammasom-induzierten IL-1 β -Freisetzung (14). Daher wird das Vorhandensein von reifer, proteolytisch verarbeiteter Caspase-1 *in vitro* häufig als Marker für die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung verwendet (10,26). Da sich die Caspase-1 an unterschiedlichen Stellen selbst spalten und damit aktivieren kann, wurden bereits unterschiedliche Zusammensetzungen für die aktive Caspase-1 nachgewiesen (Kapitel 1.1.1.3). In den meisten Zellstimulationsstudien werden Zelllysate oder zellfreie Überstände stimulierter Immunzellen auf die Spaltfragmente p10 und/oder p20 untersucht (26,46,307,340). In anderen Studien wurde jedoch auch die p33-Spezies als aktive Formen von Caspase-1 identifiziert (44). Es ist bereits bekannt, dass es schwierig ist, die aktive Caspase-1 im Zytosol von humanen Monozyten mittels Immunoblot nachzuweisen (341,342). Eine mögliche Erklärung dafür lieferten Untersuchungen in THP-1 Monozyten, die feststellten, dass die aktive Caspase-1 im zytosolischen Milieu wenig stabil war (340). Die Studie konnte nachweisen, dass die aktive Caspase-1 in Überständen über einen längeren Zeitraum nachweisbar war als in Lysaten (340). Um die Beteiligung der Caspase-1 an der Ap4- und Nigericin-vermittelten Entzündungsreaktion zu überprüfen, wurden die Überstände stimulierter THP-1 Monozyten und THP-1 Makrophagen mittels Western Blot auf die aktive Caspase-1 untersucht. Allerdings gestaltete sich die Detektion der aktiven Caspase-1 als schwierig. Im Verlauf der Arbeit wurden verschiedene Techniken zur Protein-Präzipitation aus dem Zellkulturüberstand getestet (Daten nicht gezeigt), darunter die Methanol/Chloroform-Präzipitation oder Trichloroacetat-Präzipitation (343). Schlussendlich war nur die Aufkonzentrierung der Proteine mithilfe von Zentrifugalfiltern erfolgreich.

Ich konnte nachweisen, dass Nigericin in *geprimten* THP-1 Monozyten und Makrophagen die Prozessierung der Caspase-1 in ihre aktive Form induzierte. Im Gegensatz dazu aktivierte Ap4 die Caspase-1 weder in THP-1 Monozyten noch in THP-Makrophagen (Abbildungen 3.29 und 3.30). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Caspase-1 an der NLRP3-abhängigen, jedoch nicht an der

NLRP3-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung beteiligt ist. Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass die Ergebnisse in THP-1 Makrophagen zu einem späteren Zeitpunkt nicht reproduziert werden konnten. Möglicherweise liegt dies an der geringen Menge an aktiver Caspase-1. Die geringen Mengen an aktiver Caspase-1 in THP-1 Zellen sind in der Literatur als Herausforderung für die Detektion der aktiven Caspase-1 in Überständen von THP-1 Zellen beschrieben worden (344). Deshalb wird eine hohe Zelldichte während des Experiments empfohlen, um den Nachweis der aktiven Caspase-1 mittels Western Blot in THP-1 Zellen zu gewährleisten (344). Da unter den gleichen experimentellen Bedingungen die Zellzahl der THP-1 Monozyten höher gehalten werden konnte als die Zellzahl der THP-1 Makrophagen, zeigt dies, warum sich Monozyten besser für die Untersuchung der aktiven Caspase-1 im Zellkulturüberstand mittels Western Blot eignen als THP-1 Makrophagen und liefert zumindest eine mögliche Erklärung, warum die Versuche in THP-1 Makrophagen nicht reproduziert werden konnten.

Um die Beteiligung der Caspase-1 an der Ap4- oder Nigericin-induzierten IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen genauer zu untersuchen, wäre es interessant weitere Experimente durchzuführen, die die aktive Caspase-1 ohne den Einsatz der Western Blot Analytik nachweisen. Dafür würde sich beispielsweise die Verwendung von synthetischen Biolumineszenz-Substraten der Caspase-1 (Z-WEHD-Aminoluciferin) oder fluorochrom-markierten Caspase-1-Inhibitoren (*fluorochrome inhibitor of caspases*, FLICA, z. B. FAM-YVAD-FMK) eignen (345–348). FLICA binden kovalent an die aktive Caspase-1, sodass das Fluoreszenzsignal, gemessen mit einem Mikroplattenleser, Fluoreszenzmikroskop oder Durchflusszytometer, ein direktes Maß für die Menge der aktiven Caspase-1 liefert. Bei Verwendung des Biolumineszenz-Substrat Z-WEHD-Aminoluciferin, setzt die Caspase-1 Aminoluciferin aus dem synthetischen Peptidsubstrat frei, was zu Luciferase-Aktivität und Lichterzeugung durch Luciferase führt. Die Messung der Lumineszenz mithilfe eines Mikroplattenlesers gibt Rückschlüsse auf die Caspase-1-Aktivität. Mithilfe des Biolumineszenz-Substrat kann die aktive Caspase-1 sowohl im Zytosol als auch in Zellkulturüberständen detektiert werden. So konnte durch den Einsatz des Biolumineszenz-Substrats Z-WEHD-Aminoluciferin die Caspase-1-Aktivierung bereits in PMA-differenzierten als auch in undifferenzierten THP-1 Zellen nachgewiesen werden, wenn diese mit NLRP3-Inflammasom-Induktoren behandelt wurden (348).

Die Untersuchung der Beteiligung von Caspase-1 an der IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen erfolgte durch den Einsatz des spezifischen Caspase-1 Inhibitors Ac-YVAD-cmk. Während die BzATP-, ATP- und Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung abhängig von Caspase-1 war, blieb die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung in Anwesenheit des Caspase-1 Inhibitors unberührt, was bestätigt, dass die IL-1 β -Freisetzung durch Ap4 unabhängig von der Caspase-1-Aktivität ist (Abbildung 3.29).

Obwohl andere Caspasen wie Caspase-8 IL-1 β verarbeiten können (349), ist nur Caspase-1 an der BzATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung beteiligt. ATP und Nigericin aktivieren zusätzliche Caspasen, da

eine Pan-Caspase-Hemmung die IL-1 β -Freisetzung weiter hemmt (Abbildung 3.7). Während die NLRP3-induzierte IL-1 β -Freisetzung durch Nigericin vollständig Caspase-abhängig ist, lösten die P2X7-Agonisten ATP und BzATP teilweise Caspase-unabhängige Antworten aus. Dies widerspricht der Annahme, dass die P2X7-Rezeptoraktivierung nur über Caspase-1 zur IL-1 β -Freisetzung führt (304,350,351) und unterstreicht einmal mehr wichtige Unterschiede in den Signalwegen zwischen humanen und murinen Makrophagen.

Meine Ergebnisse lassen außerdem vermuten, dass die Ap4-vermittelte Verarbeitung von Pro-IL-1 β vollständig unabhängig von Caspasen ist (Abbildung 3.29). Dies deutet auf alternative Mechanismen der Verarbeitung von IL-1 β hin. Dennoch konnte bewiesen werden, dass es sich um bioaktives IL-1 β handelt, welches seine Wirkung über IL-1-Rezeptoren vermitteln kann (Abbildung 3.16).

4.2.5.2 Caspase-unabhängige Verarbeitung von Pro-IL-1 β in aktives IL-1 β : Einfluss anderer Proteasen

Es sind bereits Caspase- und NLRP3-unabhängige Mechanismen für die IL-1 β Verarbeitung beschrieben worden (5,258,352,353). So wurde die Rolle von NLRP3- und Caspase-1-unabhängigem IL-1 β bei autoinflammatorischen Knochenerkrankungen und Osteomyelitis belegt (353). Bei einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* von Mäusen wurde IL-1 β unabhängig von Caspase-1 gebildet (354). Ebenso konnte gezeigt werden, dass Dieselrußpartikel bei Mäusen eine IL-1 β -vermittelte Lungenentzündung auslösten, die unabhängig vom klassischen NLRP3/Caspase-1-Weg war (258). Diese Feststellung deutet darauf hindeutet, dass andere Proteasen beteiligt sein könnten.

Unter anderem wurden Serinproteasen wie neutrophile Elastase, Proteinase-3 und Cathepsin G als Kandidaten für die alternative Caspase-1-unabhängige IL-1 β Verarbeitung vorgeschlagen (5,263,355). Eine Hemmung von Serinproteasen konnte die IL-1 β -Freisetzung durch humane Makrophagen unter saurem Stress reduzieren (304). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Hemmung von Serinproteasen ebenfalls eine signifikante Reduktion der IL-1 β -Freisetzung als Reaktion auf die Stimuli BzATP, ATP und Nigericin erreicht werden (Abbildung 3.8). Dies deutet darauf hin, dass Serinproteasen an der NLRP3-abhängigen und an der NLRP3-unabhängigen Freisetzung von IL-1 β beteiligt sind. Allerdings wurden widersprüchliche Ergebnisse in Ap4-stimulierten Zellen erzielt. Obwohl die IL-1 β -Freisetzung durch Ap4 ebenfalls NLRP3-unabhängig war, konnte eine Beteiligung von Serinproteasen an der Ap4-induzierten IL-1 β -Freisetzung ausgeschlossen werden (Abbildung 3.31). Eine mögliche Erklärung dafür ergab sich aus Untersuchungen mit BzATP, bei denen die Signalkaskade von P2X7-stimulierten Zellen genauer analysiert wurde. In BzATP-stimulierten Zellen führte die gleichzeitige Hemmung von Caspasen und Serinproteasen zu einer ähnlichen Verringerung der IL-1 β -Freisetzung im Vergleich zur alleinigen Caspase-Hemmung, wobei ein erhebliches Maß an IL-1 β verblieb (Abbildung

3.9). Ähnliche Ergebnisse wurden erzielt, wenn der K^+ -Efflux und Caspasen gleichzeitig gehemmt wurden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die P2X7-Rezeptoraktivierung in *geprimten* Makrophagen möglicherweise über zwei Signalwege zur IL-1 β -Freisetzung führt. Während Serinproteasen an der K^+ -Efflux/Caspase/IL-1 β -Achse beteiligt sind, verläuft ein weiterer Signalweg unabhängig vom K^+ -Efflux, von Serinproteasen und Caspasen. Die Existenz eines Signalweges, der unabhängig vom K^+ -Efflux, vom NLRP3-Inflammasom, von Serinproteasen und von Caspasen zur IL-1 β -Freisetzung führt, wird durch die Tatsache gestützt, dass die Ap4-vermittelte IL-1 β -Freisetzung ebenso unabhängig von Serinproteasen verlief (Abbildung 3.31). Daher ist es wahrscheinlich, dass auch andere Proteasen an der Verarbeitung von IL-1 β beteiligt sein könnten. Aus diesem Grund wurde auch die Rolle von Cystein- und Aspartatproteasen in Bezug auf die Freisetzung von IL-1 β untersucht. Früheren Untersuchungen konnten bereits zeigen, dass die Hemmung der Aspartatprotease die IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen, die mit Milchsäure stimuliert wurden, reduzierte (304). Allerdings konnte in THP-1 Makrophagen keine Verringerung der IL-1 β -Freisetzung bei Hemmung einer der beiden Proteaseklassen beobachtet werden (Abbildungen 3.8 und 3.31). Folglich sind Cystein- und Aspartatproteasen nicht an IL-1 β Signaltransduktion durch Ap4, ATP, BzATP und Nigericin beteiligt. Die Ergebnisse deuten auf die Existenz eines bisher unerkannten Mechanismus zur IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen hin. Es sind weitere Untersuchungen erforderlich, um den zugrunde liegenden Mechanismus zu entschlüsseln.

4.2.6 Einfluss des *Primings* auf die NLRP3-Abhängigkeit der IL-1 β -Freisetzung

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass das *Priming* für die IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen unerlässlich ist (Abbildungen 3.3, 3.11 und 3.16) (27). Die Untersuchungen der NLRP3-abhängigen und NLRP3-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung erfolgte in dieser Arbeit mit einem *Priming* durch den TLR2/1-Liganden Pam₃CSK₄. Obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass das *Priming* durch Pam₃CSK₄ erfolgen kann (22,289,356), bleibt zu beachten, dass in vielen Arbeiten zu Untersuchungen des NLRP3-Inflammasoms der TLR4-Ligand LPS für das *Priming* benutzt wurde. Im Einklang mit früheren Untersuchungen, konnte gezeigt werden, dass die *IL1B* mRNA-Spiegel durch Pam₃CSK₄ und LPS auf vergleichbare Weise erhöht werden (Abbildung 3.11) (27). Die *IL18* mRNA-Spiegel wurden im Vergleich zur Kontrolle nicht wesentlich beeinflusst, was mit der Tatsache einhergeht, dass Pro-IL-18 konstitutiv exprimiert wird und in Makrophagen nicht durch das *Priming* beeinflusst wird (15,21). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass das TLR-vermittelte *Priming* das Ausmaß der NLRP3-Abhängigkeit der P2X7-vermittelten IL-1 β -Freisetzung auf unterschiedliche Weise moduliert (Abbildung 3.11). Das *Priming* mit dem TLR2/1-Liganden Pam₃CSK₄ führte zu einer vollständig NLRP3-unabhängigen IL-1 β -Freisetzung in BzATP-stimulierten Makrophagen, während das

Priming mit TLR2/6- und TLR4-Liganden teilweise NLRP3-abhängig war. Obwohl die zugrundeliegenden Signalwege noch nicht identifiziert sind, löst die Heterodimerisierung von TLR2 mit TLR1 oder TLR6 womöglich unterschiedliche Signalkaskaden während des *Priming*-Signals aus, was früheren Hypothesen widerspricht (357). Daher wäre es interessant, die zugrundeliegenden Mechanismen im NLRP3-*Priming*-Weg zu bestimmen, die durch TLR-Liganden ausgelöst werden.

Es gibt Hinweise dafür, dass die P2X7-Rezeptorexpression im zentralen Nervensystem durch TLR-Agonisten wie LPS erhöht wird (358). Allerdings blieb die P2X7-Rezeptorexpression durch verschiedene TLR-Agonisten unverändert (Abbildung 3.12). Daher kann zumindest der Einfluss des *Primings* auf die P2X7-Rezeptorexpression ausgeschlossen werden.

4.2.7 Einfluss von Metallothioneinen und Zink an der IL-1 β -Freisetzung

Metallothioneine (MTs) wurden bereits in der Vergangenheit mit Entzündungsreaktionen in Zusammenhang gebracht (278–280,359). Die Expression von MTs kann in verschiedenen Organen und Geweben durch entzündlichen Stress verstärkt werden (360). Es wurde bereits gezeigt, dass LPS oder IL-1 β die MT-Expression induzierten (360). Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigen, dass die MT-Expression auch durch Stimulation mit Ap4 erhöht wurde (Abbildung 3.36). Immer mehr Daten deuten darauf hin, dass Metallothionein 1 (MT1) verschiedene immunmodulatorische Wirkungen hat, indem es verschiedene Signaltransduktionswege reguliert (279). In Makrophagen begünstigen hohe MT1-Konzentrationen LPS-induzierte Entzündungsreaktionen, darunter auch die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β (279). Makrophagen, denen es an MT1- und MT2 fehlte, reagierten auf LPS mit einer verminderten Expression entzündlichen Zytokinen, einschließlich IL-1 β (279). MTs sind reich an Cysteinresten, die unter physiologischen Bedingungen mehrere Zink- und Kupferatome koordinieren, sodass MTs einen hohen Metallgehalt haben (278). Deswegen ist es denkbar, dass die zelluläre Akkumulation von MT von der Verfügbarkeit von zellulärem Zink abhängt (278,361). Der Zusammenhang zwischen der gesteigerten MT-Expression und Zink wird durch Ergebnisse der RNA-Seq gestützt, die zeigen, dass Ap4 die MT-Expression steigerte und gleichzeitig an biologischen Prozessen wie „zelluläre Antwort auf Zink Ionen“ beteiligt war (Abbildung 3.36). Zink ist für die Funktion des Immunsystems unerlässlich. Ein Zinkmangel trägt zu vielen klinischen Erkrankungen bei und wird mit beeinträchtigten Immunreaktionen in Verbindung gebracht (362). Die Beteiligung von Zink an der IL-1 β -Freisetzung wird allerdings kontrovers diskutiert. Es gibt Studien, die zeigen, dass Zink die IL-1 β -Freisetzung negativ reguliert. Während eine Zinksupplementierung die TLR-induzierte Expression von *IL1B* mRNA-Spiegeln *in vivo* (363,364), als auch die IL-1 β -Freisetzung in Dendritischen Zellen *in vitro* erhöhte (365), verstärkte ein Zinkmangel die Expression von *IL1B* in pro-myeloischen Zellen (366). Eine Studie zeigte, dass der Entzug von Zink in Makrophagen unter Verwendung des

Zinkchelators N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) das NLRP3-Inflammasom aktivierte und die Freisetzung von IL-1 β induzierte (367). Im Gegensatz dazu wurde jedoch auch nachgewiesen, dass Zink die IL-1 β -Freisetzung positiv regulierte, indem die Caspase-1-Aktivierung beeinflusst wurde. Eine Vorbehandlung von LPS-geprimten Mausemakrophagen mit TPEN hob die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β auf (368). Ap₄ beeinflusst zinkabhängige Prozesse und die MT-Expression (Abbildung 3.36). Um dem Einfluss von Zink und Metallothioneinen auf die Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen weiter nachzugehen, eignen sich weitere Untersuchungen, in denen die Funktion der Metallothioneine und intrazellulärem Zink gehemmt wird. So könnte die Funktion der Metallothioneine durch den Zusatz von L-Homocystein eingeschränkt werden (369), während intrazelluläres Zink durch den Chelatbildner TPEN reduziert wird (368,370).

4.2.8 NLRP3-unabhängige IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen: Fazit

IL-1 β wird mit mehreren entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht und die Regulierung der IL-1 β -Freisetzung durch das NLRP3-Inflammasom wurde in den letzten Jahren umfassend charakterisiert. Die Bedeutung der NLRP3-unabhängigen Entstehung von IL-1 β ist dagegen deutlich weniger gut untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die Existenz eines bisher unbekanntes K⁺-Efflux-, NLRP3- und Caspase-1-unabhängigen Mechanismus für die Generierung von IL-1 β in humanen Makrophagen, der durch P2X₇-Rezeptoren oder durch das Nukleotid Ap₄ über einen noch unbekanntes Rezeptor vermittelt werden kann.

In TLR2/1-geprimten Makrophagen führte eine P2X₇-Rezeptorstimulation durch zwei voneinander unabhängige Signalkaskaden zur Freisetzung von IL-1 β . Beide Signalwege verlaufen dabei NLRP3-unabhängig. Ein Weg ist abhängig von K⁺-Efflux, Caspase-1 und Serinproteasen. Im anderen Signalweg wird die Spaltung von Pro-IL-1 β weder durch Caspase-1, noch durch andere Caspasen, Serin-, Cystein- oder Aspartatproteasen verursacht, was auf einen unerkannten Mechanismus der Spaltung von Pro-IL-1 β in seine aktive Form hinweist (Abbildung 4.1).

Ebenso positionieren die Ergebnisse Ap₄ als Induktor von IL-1 β bedingten Entzündungen. Dabei erfolgte die Ap₄-induzierte IL-1 β -Freisetzung ebenfalls NLRP3-unabhängig. Im Gegensatz zur P2X₇-Rezeptor-induzierten IL-1 β -Freisetzung verlief die IL-1 β -Freisetzung durch Ap₄ allerdings auch unabhängig vom K⁺-Efflux, Caspase-1 und Serinproteasen. Eine Beteiligung von anderen Caspasen, Cystein- und Aspartatproteasen konnte ebenfalls ausgeschlossen werden. Es bleibt zu erwähnen, dass die IL-1 β -Freisetzung durch Ap₄ nur durch Zugabe millimolarer Mengen an Ap₄ erzielt werden konnten. Diese hohen Ap₄-Konzentrationen müssen *in vivo* noch bestimmt werden. Obwohl im Nebennierenmark von Rindern eine Ap₄-Konzentration von 0,8 mM identifiziert werden konnte (93) und die Ap₄-Konzentrationen in humanem Plasma doppelt so hoch waren wie die von ATP (97), wurde die

Anreicherung von Ap4 in humanem Gewebe noch nicht umfassend untersucht. Dennoch besteht die Möglichkeit einer Beteiligung an entzündlichen Erkrankungen, was die Notwendigkeit einer Untersuchung der Ap4-Konzentration in verschiedenen Geweben und entzündungsbedingten Krankheiten unterstreicht. Nichtsdestotrotz heben die Forschungsergebnisse mit Ap4 die Existenz des K⁺-Efflux-, NLRP3- und Caspase-1-unabhängigen Mechanismus für die IL-1β-Freisetzung in Makrophagen hervor.

Während sich Studien auf die Hemmung des NLRP3-Inflammasoms durch den Einsatz selektiver niedermolekularer Inhibitoren wie MCC950 konzentrieren (256), zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Hemmung des NLRP3-Inflammasoms möglicherweise nicht immer zu einer Reduktion der IL-1β Konzentration *in vivo* führt. Daher sind diese Forschungsergebnisse von entscheidender Bedeutung für das Verständnis von IL-1β bedingten Entzündungskrankheiten, was die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Modulation von Entzündungsreaktionen erleichtern wird. Weitere Studien in primären Makrophagen sind notwendig, um den zugrundeliegenden Mechanismus der alternativen Spaltung von Pro-IL-1β in die aktive Form zu identifizieren.

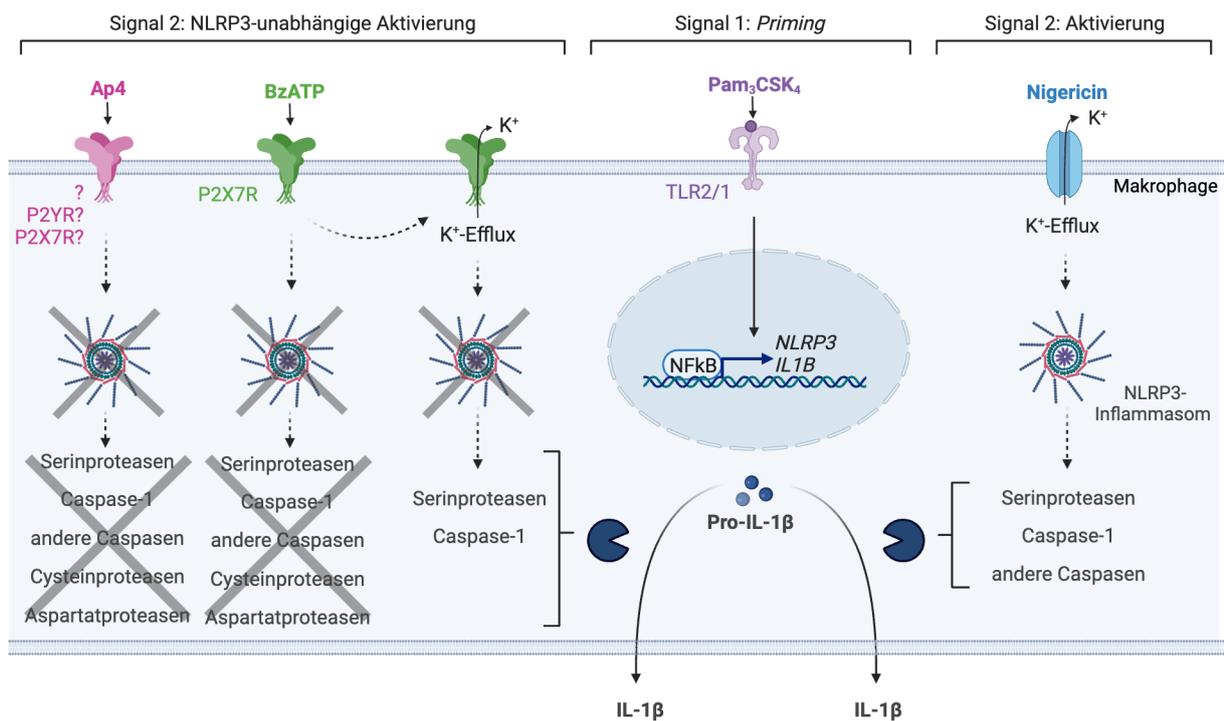


Abbildung 4.1: Möglicher Mechanismus für die NLRP3-unabhängige IL-1β-Freisetzung durch humane Makrophagen nach P2X7-Rezeptor-Aktivierung. Die Aktivierung von TLR2/1 durch Pam₃CSK₄ führt zur NF-κB-vermittelten Produktion von Pro-IL-1β und Komponenten des NLRP3-Inflammasoms. Der durch Nigericin-vermittelte K⁺-Efflux führt zur NLRP3-Inflammasom-Oligomerisierung, die eine Serinprotease- und Caspase-abhängige IL-1β-Freisetzung bewirkt. Im Gegensatz dazu löst die Stimulation des

P2X7-Rezeptors durch BzATP zwei unterschiedliche Mechanismen der IL-1 β -Freisetzung aus, die beide NLRP3-unabhängig sind. Ein Mechanismus beruht auf dem K⁺-Efflux und erfordert die Aktivierung von Caspase-1 und Serinproteasen. Der andere Mechanismus ist unabhängig von K⁺-Efflux, Caspasen und Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen. Die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung ist unabhängig vom K⁺-Efflux, NLRP3-Inflammasom, Caspasen, Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen, was auf die Beteiligung anderer Mechanismen zur proteolytischen Verarbeitung von IL-1 β hindeutet. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (247).

4.3 Einfluss von HDAC6 auf NLRP3-vermittelte Entzündungsreaktionen

4.3.1 PROTAC LS-91 führt zum Abbau von HDAC6 in Makrophagen

Da PROTACs in der Lage sind, Proteine gezielt abzubauen, besteht großes Interesse an der Entwicklung neuer PROTACs zur Behandlung von Krankheiten, bei denen eine übermäßige Aktivität oder ein erhöhter Spiegel eines Proteins vorliegt. HDAC6, ein Protein, das mit Krankheiten wie Krebs, Chorea Huntington, Parkinson und Alzheimer in Verbindung gebracht wird (138), hat das Interesse an der Entwicklung von maßgeschneiderten HDAC6-PROTACs weiter gesteigert.

In letzter Zeit wurde auch die Bedeutung von HDAC6 bei NLRP3-Inflammasom-vermittelten Entzündungsreaktionen diskutiert (42,175,177). Die Ubiquitin Bindungsfähigkeit durch die Zn-UBP-Domäne von HDAC6 ist entscheidend für die Beteiligung an der NLRP3-Inflammasom Signalkaskade in Mäusen (42). Magupalli et al. zeigte, dass ubiquitinierte NLRP3 Komponenten mithilfe der HDAC6/Dynein Maschinerie in TGN-Vesikeln entlang des Mikrotubuli-Apparats zum MTOC transportiert werden. Dort erfolgt die Zusammenlagerung mit der im MTOC lokalisierten NEK7, die die Aktivierung und den Aufbau des NLRP3-Inflammasoms vermittelt (42). Durch einen CRISPR/Cas9-vermittelten HDAC6-Knockout verringerte sich die Nigericin-induzierte NLRP3-Aktivität in Mauszellen. Es kam zu einer verminderten Caspase-1 Prozessierung und sowohl die IL-1 β -Freisetzung als auch die Pyroptose waren reduziert. Diese Untersuchungen stehen teilweise im Gegensatz zu den Arbeiten von Hwang et al., die gezeigt haben, dass ein HDAC6 knock-down in Mauszellen zu einer verstärkten Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt, was durch eine verstärkte Caspase-1 Verarbeitung und einer erhöhten ATP-induzierten IL-1 β -Freisetzung belegt wurde (183). Obwohl ein gegenteiliger Effekt von HDAC6 auf die NLRP3-vermittelte Entzündung beobachtet wurde, zeigen beide Arbeiten, dass sowohl Ubiquitinierung von NLRP3 als auch das Vorhandensein der ZnF-UBP-Domäne von HDAC6 für den Effekt auf die NLRP3-vermittelte Entzündung erforderlich ist. Die ZnF-UBP lässt sich jedoch nicht durch niedermolekulare HDAC6-Inhibitoren hemmen (154,184). Deshalb sind andere Strategien wie DNA-basierte und PROTAC-Technologien erforderlich, um die Bedeutung des ZnF-UBP zu untersuchen. Der Einsatz von HDAC6-PROTACs könnte deshalb eine neue Strategie zur Behandlung

von Krankheiten mit abnormaler HDAC6-Aktivität oder erhöhten HDAC6-Proteingehalten sein und bei NLRP3-Inflammasom-assoziierten Krankheiten Verwendung finden (178). In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob das PROTAC LS-91 HDAC6 abbaut und ob der HDAC6-Abbau Auswirkungen auf NLRP3-vermittelte Entzündungen in humanen Zellen hat.

Es ist bereits bekannt, dass nur geringe Konzentrationen von PROTACs notwendig sind, um Proteine abzubauen, da PROTACs lediglich als Vermittler zwischen dem Protein und der E3-Ligase dienen und anschließend recycelt werden (190,371,372). Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, da gezeigt wurde, dass LS-91 bereits in geringen Konzentrationen von 0,1 μM zu einem signifikanten HDAC6-Abbau in THP-1 Makrophagen führte. In einer Konzentration von 10 μM erzielte LS-91 eine maximale Degradierung von HDAC6 in THP-1 Makrophagen. Bei der Verwendung von höheren LS91-Konzentrationen wurde der gezielte Proteinabbau jedoch abgeschwächt. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit einem HDAC6-PROTAC aus einem Indirubin-abgeleiteten HDAC-Inhibitor und dem E3-Ligase-Liganden Pomalidomid (178). Bis zur Überschreitung einer bestimmten PROTAC Konzentration führte das HDAC6-PROTAC zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der HDAC6-Proteinmengen, stiegen die Konzentration des PROTACs weiter an, wurde ein geringerer HDAC6-Abbau beobachtet (178). Die Konkurrenzsituation zwischen den verschiedenen Protein-Komplexen ist ein wichtiger Faktor bei der Anwendung von PROTACs und kann Auswirkungen auf den Abbau des Zielproteins haben. Aufgrund der Konkurrenzsituation können sich vermehrt binäre Zielprotein-PROTAC-Komplexe oder E3-Ligase-PROTAC-Komplexe anstelle des gewünschten ternären Zielprotein-PROTAC-E3-Ligase-Komplexes bilden, was als "*Hook-Effekt*" bezeichnet wird (284,285,373). Wird der ternäre Komplex nicht gebildet, kann die E3-Ligase das Zielprotein, in diesem Fall HDAC6, nicht ubiquitinieren, wodurch der Abbau nicht stattfindet.

Da LS-91 die HDAC6-Proteingehalte signifikant senkte, wäre ein Einsatz bei Erkrankungen denkbar, die mit erhöhtem HDAC6-Proteinspiegel in Verbindung gebracht werden. Es gibt bereits HDAC6-PROTACs die Erfolge bei der Behandlung von Krebs zeigten (374). Um zu untersuchen, ob LS-91 zur Behandlung von NLRP3-Inflammasom-assoziierten Krankheiten eingesetzt werden könnte, wurde zunächst den Einfluss von LS-91 auf NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen getestet.

4.3.2 Die PROTAC-vermittelte Reduzierung der IL-1 β -Ausschüttung ist unabhängig von den HDAC6-Proteingehalten

Durch den Einsatz des PROTACs LS-91 konnte eine Reduktion der ATP- und Nigericin-induzierten IL-1 β -Freisetzung in THP-1 Makrophagen festgestellt werden, was mit Studien einhergeht, die den Effekt des PROTACs zusätzlich auch im Mausmodell bestätigten (178).

Um die spezifische Auswirkung des HDAC6-Abbaus durch das PROTAC LS-91 zu bestätigen, wurde die Kontrollsubstanz SLW118 eingesetzt. SLW118 wurde am Glutarimidring des Thalidomidbausteins methyliert, wodurch der HDAC6-Abbau erfolgreich verhindert werden konnte (Abbildung 3.38). Auch eine Ethylierung am Stickstoff des Glutarimidrings von Pomalidomid verhinderte die Bindung an der E3-Ligase und damit einen HDAC6-Abbau (178). Dies unterstreicht die Bedeutung des Glutarimidrings für die Bindung an die E3-Ligase für die Funktion von PROTACs (204–206).

Da die Kontrolle SLW118 die ATP und Nigericin-induzierte IL-1 β -Freisetzung auf ähnliche Weise wie LS-91 senkte, war die HDAC6-Degradierung nicht ausschlaggebend für die reduzierte NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit von Kontrollsubstanzen, damit die spezifischen Wirkungen der PROTACs bestätigt werden können (375). Trotzdem werden die biologischen Effekte von Kontrollsubstanzen bisher nicht immer untersucht. So wurde in einer früheren Arbeit die Auswirkung des Kontroll-PROTACs auf die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung nicht untersucht (178) Daher kann nicht ausgemacht werden, ob die reduzierte IL-1 β -Freisetzung tatsächlich durch einen HDAC6-Abbau erfolgte, oder andere Mechanismen dafür verantwortlich sind. In der Tat senkte die PROTAC-Komponente 8a, ein HDAC6-Inhibitor, ebenfalls die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung (178).

Demnach ist nicht auszuschließen, dass die Einzelkomponenten der bifunktionellen Moleküle Wirkungen erzielen, ohne das Zielprotein zu degradieren. Dies könnte erklären, warum die Negativkontrolle SLW118 den gleichen Effekt auf die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung wie LS-91 erzielte.

4.3.3 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Freisetzung von IL-1 β

SLW118 und LS-91 bestehen aus dem pan-HDAC-Inhibitor SAHA, der für die Bindung an HDAC6 verantwortlich ist. Während SAHA neben HDAC6 auch HDAC1, 2 und 3 inhibiert (151,173), erreichen PROTACs trotz unselektivem HDAC-Gerüst einen selektiven Abbau von HDAC6 (199,203). So wurde bereits gezeigt, dass LS-91 in HL-60 Zellen in Konzentrationen von 10 μ M nur HDAC6 abbaut, während die Proteingehalte von HDAC1 und HDAC4 unverändert blieben (203). Um die Auswirkung der gezielten HDAC6-Hemmung auf die IL-1 β -Freisetzung zu untersuchen, wurde nicht nur den pan-HDAC-Inhibitor SAHA verwendet, sondern auch der selektive HDAC6-Inhibitor Tubastatin A (174,175). Niedermolekulare HDAC6-Inhibitoren hemmen dessen katalytische Aktivität (154,184). Die Deacetylierung von α -Tubulin dient als Marker, um die katalytische Aktivität von HDAC6 zu untersuchen. HDAC6-Inhibitoren führen, ebenso wie ein HDAC6-Mangel, zu einer gesteigerten Acetylierung von α -Tubulin (42,175,178,183). Deshalb wurde als nächstes untersucht, ob eine Hemmung der katalytischen Domäne von HDAC6 durch den Baustein SAHA oder Tubastatin A für die

gesenkte NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung ausreichend ist. Die Ergebnisse zeigen, dass durch den HDAC6-Inhibitor Tubastatin A und den pan-HDAC-Inhibitor SAHA die ATP-induzierte Freisetzung von IL-1 β in THP-1 Zellen reduziert oder sogar verhindert werden konnte.

Generell wird die Rolle der katalytischen Domäne von HDAC6 auf die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung in der Literatur kontrovers diskutiert und wurde bisher selten in humanen Zellen getestet (178). Es gibt Untersuchungen in Mauszellen, die zeigen, dass Tubastatin A keinen Einfluss auf die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung hat (183), während andere Daten belegen, dass HDAC6-Inhibitoren NLRP3-vermittelte Entzündungen abschwächen (175,376,377). In zwei Studien wurde gezeigt, dass HDAC6-Inhibitoren in Mauszellen die Interaktion von HDAC6 mit Dynein verhindert (42,175). Durch das Ausbleiben der Bindung von HDAC6 an Dynein, ist der Transport von NLRP3 entlang der Mikrotubuli zum MOTC gestört, was mit einer reduzierten IL-1 β -Freisetzung einhergeht. Beide Gruppen zeigen, dass der Einsatz von HDAC6-Inhibitoren *in vivo* in der Maus ebenfalls die LPS-vermittelte Entzündungsreaktionen abschwächt.

4.3.4 Einfluss von HDAC6 auf das *Priming*

Das *Priming* mit einem TLR-Liganden ist Voraussetzung, dass eine Stimulation mit ATP oder Nigericin eine IL-1 β -Freisetzung auslöst (Abbildung 3.3) (14,27). Dabei zeigte sich, dass die Inkubation mit LS-91 keinen Effekt auf die *IL1B* mRNA-Expression durch den TLR2/1-Liganden Pam₃CSK₄ hatte. Dies deckt sich mit Studien in Mauszellen, die zeigten, dass ein HDAC6-Mangel keinen Einfluss auf die TLR-vermittelte *NLRP3* und *IL1B* Genexpression oder Pro-IL-1 β -Proteinlevel hat (42,183). Die Auswirkungen eines durch die PROTAC-Strategie ausgelösten HDAC6-Abbaus auf den TLR-Signalweg hat bislang jedoch nur eine Studie untersucht (178). Das HDAC6-PROTAC hatte *in vivo* in der Maus keinen signifikanten Effekt auf die TLR-induzierten TNF-Serumspiegel. Meine Ergebnisse zeigen, dass dies in humanen Zellen jedoch nicht der Fall war. LS-91 senkte die Pam₃CSK₄-induzierten TNF-Level in THP-1 Makrophagen. Dies zeigt, dass LS-91 in humanen Zellen mit dem TLR-Signalweg zu interagieren scheint, auch wenn die *IL1B* Genexpressionslevel davon unberührt blieben.

Betrachtet man die Auswirkung von LS-91 und SLW118 auf die NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung und auf die Pam₃CSK₄-vermittelte TNF-Freisetzung, fällt auf, dass beide Substanzen die IL-1 β und TNF-Zytokinspiegel auf ein ähnliches Level senkten. Dies lässt darauf schließen, dass eine Beeinflussung des *Primings* durch LS-91 und SLW118 für die reduzierten IL-1 β -Zytokinspiegel verantwortlich ist, die ebenfalls unabhängig vom HDAC6-Abbau sind.

Es gibt Hinweise darauf, dass HDAC6-Inhibitoren die TLR-Signalübertragung beeinflussen können, indem sie die Acetylierung verschiedener an diesem Signalweg beteiligter Proteine modulieren. Durch HDAC6-Inhibitoren steigt die Acetylierung von p65, einer Untereinheit des NF- κ B

Transkriptionskomplexes (378). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine entscheidende Rolle. Er wird durch die TLR-vermittelte Signalgebung aktiviert und fördert somit die Expression von beispielsweise Pro-IL-1 β oder NLRP3 (379,380). Durch die gesteigerte Acetylierung von p65 durch HDAC6-Inhibitoren wird die NF- κ B Translokation aus dem Zellkern ins Zytosol reguliert (381), wodurch sich die NF- κ B-vermittelte NLRP3-Expression verringert (378,382). HDAC6-Inhibitoren hemmen außerdem die TLR-induzierte Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 in Mäusen, was mit einer gesteigerten Mikrotubuli-Acetylierung in Zusammenhang steht (383–385). Diese Studien zeigen, dass eine HDAC6-Inhibierung das TLR-vermittelte *Priming* abschwächt, was auch in einer reduzierten IL-1 β -Zytokinfreisetzung resultiert. Dies könnte erklären, dass die gesenkte TNF-Freisetzung durch LS-91 und SLW118 tatsächlich auf die Interaktion des HDAC-Inhibitors SAHA, der Bestandteil beider Substanzen ist, mit dem TLR-Signalweg zurückzuführen ist. Meine Ergebnisse stärken diese Theorie, da die NLRP3-induzierte IL-1 β -Freisetzung gesenkt wurde, wenn HDAC-Inhibitoren 24 Stunden vor dem TLR-vermittelten *Priming* hinzugefügt wurden, sie allerdings unverändert blieb, wenn der HDAC6-Inhibitor Tubastatin A nach dem *Priming* hinzugefügt wurde und somit die TLR-Signalgebung nicht weiter beeinflussen konnte. Bei der Zugabe der Inhibitoren vor dem *Priming* konnte außerdem beobachtet werden, dass der pan-HDAC-Inhibitor SAHA die IL-1 β -Freisetzung stärker unterdrückte als der spezifische HDAC6-Inhibitor Tubastatin A. Dies lässt vermuten, dass nicht nur HDAC6, sondern auch HDAC1, 2 und 3, an der Beeinflussung der TLR-Signalgebung beteiligt sind, was auch schon durch andere Studien gezeigt werden konnte (381).

Neben SAHA, sind Thalidomid und das methylierte Thalidomid Derivat SLW120 Bestandteile von LS-91 bzw. SLW118. Immunmodulatorische IMiDs wie Thalidomid können ebenso TLR-Antworten negativ regulieren (286) und damit einen Einfluss auf die NLRP3-Aktivierung haben. Thalidomid reduzierte sowohl die TLR4- als auch TLR2-induzierte TNF-Freisetzung, indem es die Proteinexpression von MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) senkte (286). MyD88 ist ein Adapterprotein der TLRs, das nach Aktivierung zur Bildung eines Signalkomplexes führt, und über eine intrazelluläre Signalkaskade zur NF- κ B und AP-1-vermittelten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, Pro-IL-1 β und NLRP3 führt (380,386). Die gesenkte NLRP3-vermittelte IL-1 β -Freisetzung durch LS-91 und SLW118 könnte demnach auch auf die Beeinflussung von Thalidomid mit dem TLR-Signalweg zurückzuführen sein. Wurde Thalidomid oder SLW120 vor dem *Priming* zugefügt, konnten die ATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung nämlich ebenso gesenkt werden. Die entzündungshemmenden Eigenschaften von Thalidomid werden bei Mäusen zumindest teilweise durch Cereblon-unabhängige Prozesse vermittelt (387), die Wirkungen von methyliertem Thalidomid sind völlig unabhängig von Cereblon.

4.3.5 Rolle von HDAC an NLRP3-bedingten Entzündungen: Fazit

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein HDAC6-Abbau in THP-1 Makrophagen nicht notwendig für die verminderte NLRP3-vermittelte Entzündung war. Auch der niedermolekulare HDAC6-Inhibitor Tubastatin A scheint keinen Effekt auf die IL-1 β -Spiegel zu haben, wenn er nach dem TLR-vermittelten *Priming* zugegeben wurde. Alle Effekte der HDAC6-Inhibierung auf die NLRP3-vermittelte Entzündungsreaktion lassen sich auf die Interaktion mit dem TLR-Signalweg zurückführen. Da bisherige Studien von HDAC6-Inhibitoren und Thalidomid in Mauszellen durchgeführt wurden, wäre es sinnvoll, die Effekte von niedermolekularen HDAC6-Inhibitoren sowie Thalidomid auf die *IL1B* Genexpression oder Pro-IL-1 β -, Caspase-1-, NLRP3- und TNF-Proteinlevel in humanen Zellen genauer zu untersuchen. Die Ergebnisse lassen allerdings vermuten, dass die katalytische Domäne von HDAC6 entscheidend für die Beeinflussung des TLR-Signalwegs ist (Abbildung 4.2). In dieser Arbeit wurde das *Priming* über den TLR2/1-Signalweg induziert. Da das *Priming* auch durch andere TLRs wie TLR4 erfolgen kann und die Vorstimulation durch verschiedene TLRs einen Einfluss auf die NLRP3-vermittelte Entzündungsreaktion haben kann (Kapitel 4.3.4), ist es sinnvoll, die Effekte der HDAC6-Inhibitoren auf andere TLRs genauer zu untersuchen.

In humanen Zellen wird demnach der Transport von NLRP3, anders als in der Maus, nicht durch die HDAC6/Dynein Maschinerie entlang des MTOC gesteuert. Die Beteiligung von HDAC6 an der NLRP3-vermittelten Entzündung wird in vorangegangenen Arbeiten fast ausschließlich in Mauszellen oder im Mausmodell untersucht. Es sollten weitere Studien in humanen Primärzellen folgen, um das therapeutische Potential von HDAC6-Inhibitoren als wirksame entzündungshemmende Substanzen besser bewerten zu können.

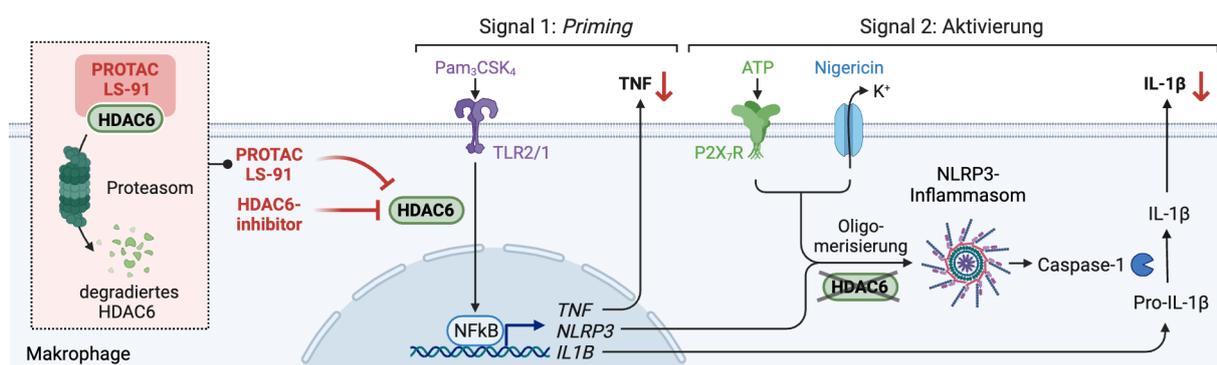


Abbildung 4.2: HDAC6 beeinflusst das *Priming* in Makrophagen. Das PROTAC LS-91 und der niedermolekulare HDAC6 Inhibitor Tubastatin A interagieren mit dem TLR-Signalweg in humanen Makrophagen, was in einer verminderten IL-1 β -Freisetzung resultiert. Die Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms ist in humanen Makrophagen anders als in Mausmakrophagen unabhängig von HDAC6. Die Abbildung ist ein modifizierter Nachdruck nach (207) mit Erlaubnis von Elsevier.

5. Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

Entzündungen spielen eine zentrale Rolle bei der Entstehung zahlreicher Krankheiten, die sowohl erregerbedingte Infektionskrankheiten als auch nicht-infektiöse Erkrankungen wie Krebs, Herzerkrankungen und Diabetes umfassen. Ein primärer Botenstoff, der für die Vermittlung von Entzündungen verantwortlich ist, ist das proinflammatorische Zytokin Interleukin (IL)-1 β .

Das derzeitige Verständnis der IL-1 β -Freisetzung beinhaltet ein zweistufiges Modell. Ein erstes Signal (*Priming*) induziert die Transkription und Translation des Vorläufers Pro-IL-1 β und kann unter anderem durch Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLRs) erfolgen. Ein nachfolgendes zweites Signal vermittelt die proteolytische Spaltung von Pro-IL-1 β in aktives IL-1 β . Es wird angenommen, dass unter anderem die Stimulation des P2X7-Rezeptors als zweites Signal dient und die IL-1 β -Freisetzung durch Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Makrophagen auslöst. Der nichtselektive Ionenkanal wird durch den endogenen Liganden Adenosintetrphosphat (ATP) und sein synthetisches Derivat 2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP) aktiviert. Bisher wird die IL-1 β -Freisetzung allerdings häufig in Makrophagen, die aus dem Knochenmark von Mäusen stammen, untersucht. Humane Makrophagen werden selten diskutiert. Das Verständnis des Mechanismus der IL-1 β Prozessierung in humanen Makrophagen eröffnet neue Möglichkeiten für die Behandlung von Entzündungskrankheiten. In der vorliegenden Arbeit dienten deshalb humane Makrophagen als *in vitro* Modell zur Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus der P2X7-vermittelten IL-1 β -Freisetzung. Dafür wurden THP-1 Makrophagen und U937 Makrophagen verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die optimalen Kulturbedingungen für die Differenzierung von aus U937 Monozyten-stammende Makrophagen etabliert, die zur Ausbildung zellspezifischer Oberflächenmarker führte und in einer entzündlichen Antwort auf Lipopolysaccharid (LPS) resultierte.

In dieser Arbeit wird über einen bisher unerkannten Mechanismus der P2X7-Rezeptor-vermittelten IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen berichtet. Obwohl die Aktivierung des P2X7-Rezeptors durch ATP und BzATP die Freisetzung von IL-1 β in *geprimten* Makrophagen erhöhte, verlief die Freisetzung unabhängig vom NLRP3-Inflammasom. Der NLRP3-Inhibitor MCC950 (CRID3) konnte die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung in TLR2/1-*geprimten* Makrophagen nicht reduzieren. In *geprimten* NLRP3-Knockout-Makrophagen führte die Aktivierung des P2X7-Rezeptors zu einer signifikanten IL-1 β -Freisetzung. Die Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration sowie die Hemmung von Caspase-1 oder Serinproteasen, die in der Signalgebung mit der NLRP3-Aktivierung in Verbindung stehen, reduzierten die IL-1 β -Freisetzung lediglich auf 50 %. Durch weitere Untersuchungen wurde die Existenz von zwei Signalwegen hervorgehoben, die nach P2X7-Rezeptor-Stimulation zur IL-1 β -Freisetzung führen, wobei beide Signalwege in TLR2/1-*geprimten* Makrophagen nicht auf die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms angewiesen sind. Ein Signalweg ist abhängig von K⁺-Efflux,

Caspase-1 und Serinproteasen, während der andere Weg unabhängig von K^+ -Efflux, Caspasen sowie Serin-, Cystein- und Aspartatproteasen agiert. Dies legt nahe, dass bisher unbekannte Mechanismen bei der proteolytischen Verarbeitung von IL-1 β beteiligt sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde das *Priming* hauptsächlich über den TLR2/1-Signalweg induziert. Es konnte bestätigt werden, dass das *Priming* auch durch andere TLRs wie TLR2/6 oder TLR4 erfolgen kann und die Aktivierung verschiedener TLRs unterscheidet, ob die Stimulation des P2X7-Rezeptors eine NLRP3-abhängige oder -unabhängige IL-1 β -Freisetzung auslöst. Zukünftige Studien sollten die Beteiligung der TLR-Signalwege auf die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung weiter erforschen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die immunmodulatorischen Eigenschaften des endogenen Nukleotids Adenosintetraphosphat (Ap4) untersucht, welches ein Derivat von ATP darstellt. Gemäß der Zielsetzung konnte nachgewiesen werden, dass Ap4 in humanen Makrophagen die Freisetzung von bioaktivem IL-1 β induzierte. In weiteren Experimenten wurde die Beteiligung verschiedener P2X-Rezeptoren, insbesondere des P2X7-Rezeptors untersucht. Der reversible P2X7-Rezeptorantagonist A804598 beeinflusste die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung nicht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Ap4 trotz struktureller Ähnlichkeiten zu ATP die IL-1 β -Freisetzung unabhängig von einer Aktivierung des P2X7-Rezeptors vermittelt. Weitere Untersuchungen bekräftigten dieses Ergebnis und zeigten, dass eine Beteiligung des P2X7-Rezeptors an der Ap4-vermittelten Reaktion unwahrscheinlich ist. Während eine Stimulation von THP-1 Makrophagen mit BzATP zur Ausbildung einer 900 kDa Membranpore führte, die durch eine P2X7-Rezeptoraktivierung vermittelt wurde, blieb dieser Effekt durch Stimulation mit Ap4 aus. Außerdem induzierte Ap4 im Gegensatz zu BzATP in P2X7-Rezeptor-transfizierten HEK293 Zellen keinen Calciumeinstrom. Allerdings reduzierte eine Vorstimulation mit Ap4 die BzATP-induzierte IL-1 β -Freisetzung. Daher ist die Beteiligung des P2X7-Rezeptors nicht komplett auszuschließen. Um nähere Erkenntnisse über die potenzielle Interaktion von Ap4 mit dem P2X7-Rezeptor zu gewinnen sind weitere Forschungsarbeiten notwendig.

Weitere Untersuchungen machen deutlich, dass Ap4 die Freisetzung von IL-1 β unabhängig vom K^+ -Ausstrom und dem NLRP3-Inflammasom vermittelt und machen die Existenz eines unbekanntes NLRP3-unabhängigen Mechanismus für die IL-1 β -Freisetzung in Makrophagen deutlich. Weder die Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration noch die Inhibition des NLRP3-Inflammasoms beeinträchtigten die Freisetzung von IL-1 β in Reaktion auf Ap4-Stimulation. Eine Stimulation *geprimter* NLRP3-Knockout-THP-1 Makrophagen führte zu einer signifikanten IL-1 β -Freisetzung. In Anwesenheit von Caspase, Serin-, Cystein- und Aspartatprotease-Inhibitoren blieb die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung unberührt. Dies unterstreicht die Bedeutung der Identifikation alternativer Mechanismen der Pro-IL-1 β Spaltung, um ein tieferes Verständnis der involvierten Mechanismen zu erlangen.

Da Ap4 in THP-1 Monozyten einen Calciumeinstrom vermittelt, der sich durch den G_{q/11} Inhibitor YM-254890 blockieren ließ, deutet dies auf die Beteiligung von metabotropen P2Y-Rezeptoren an der Ap4-vermittelten Reaktion hin. Deshalb sollte in weiteren Studien die Beteiligung von P2Y-Rezeptoren auf die Ap4-induzierte IL-1 β -Freisetzung untersucht werden. Außerdem wurden die genomweiten Expressionsprofile von ATP und Ap4 in Makrophagen miteinander verglichen. Ap4 erhöhte dabei im Gegensatz zu ATP die Expression der Metallothioneine gegenüber der Kontrolle signifikant.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die Beteiligung der Histondeacetylase 6 (HDAC6) an der IL-1 β -Freisetzung untersucht. Bereits publizierte Daten zeigen, dass HDAC6 in Mauszellen mit dem Aufbau und der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Verbindung gebracht werden kann. Um die Beteiligung von HDAC6 an der NLRP3-vermittelten IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen zu untersuchen, wurde mit der PROTAC (*proteolysis targeting chimeras*)-Strategie ein HDAC6-Abbau erzeugt und dessen Auswirkung auf die IL-1 β -Freisetzung untersucht. Dafür wurde das HDAC6-PROTAC LS-91 verwendet, das aus dem pan-HDAC-Inhibitor SAHA und dem E3-Ligase-Liganden Thalidomid besteht, sowie ein Kontroll-PROTAC (SLW118), das an HDAC6 bindet, aber nicht in der Lage ist, den HDAC6-Abbau zu induzieren. LS-91, aber nicht SLW118, verringerte die HDAC6-Proteinspiegel in THP-1 Makrophagen, ohne die Viabilität der Zellen zu beeinträchtigen. Die IL-1 β -Freisetzung verringerte sich allerdings sowohl durch LS-91 als auch durch SLW118 konzentrationsabhängig, was darauf hindeutet, dass ein HDAC6-Abbau nicht für die Hemmung der NLRP3-vermittelten IL-1 β -Freisetzung notwendig ist. Es konnte festgestellt werden, dass die Hemmung der katalytischen Domäne mit dem HDAC-Inhibitor SAHA oder dem spezifischen HDAC6-Inhibitor Tubastatin A ausreicht, um die IL-1 β -Freisetzung zu reduzieren. Daher konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität von HDAC6 für die Funktion des NLRP3-Inflammasoms entscheidend ist. Da Tubastatin A keinen Einfluss auf die IL-1 β -Freisetzung hatte, wenn es nach dem TLR-vermittelten *Priming* hinzugefügt wurde, könnten die beobachteten Auswirkungen der HDAC6-Hemmung auf NLRP3-vermittelte Entzündungsreaktionen mechanistisch gesehen auf die Interaktion mit der TLR (*toll like receptor*)-Signalgebung zurückzuführen sein. Um dieses Ergebnis weiter zu bekräftigen, sollten in Zukunft die Effekte von niedermolekularen HDAC6-Inhibitoren als auch Thalidomid auf die *IL1B* Genexpression oder Pro-IL-1 β -, Caspase-1-, NLRP3- und TNF-Proteingehalte in humanen Makrophagen genauer untersucht werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass HDAC6-Inhibitoren eine starke entzündungshemmende Wirkung haben und die Freisetzung von IL-1 β durch humane Makrophagen unabhängig von der NLRP3-Oligomerisierung und Aktivierung unterdrückt wird.

Die Untersuchungen dieser Arbeit zur IL-1 β -Freisetzung in humanen Makrophagen verdeutlichen die artspezifischen Diskrepanzen in der Funktionalität von Makrophagen zwischen Maus und Mensch. Da die artspezifischen Voraussetzungen für die NLRP3-unabhängige, sowie die HDAC6-vermittelte NLRP3-Aktivierung bei Mäusen offenbar nicht erfüllt sind, sollten Studien in humanen Primärzellen

oder humanisierten Mäusen in Betracht gezogen werden, um die Rolle der IL-1 β Signalgebung weiter zu untersuchen und diese Ergebnisse zu bekräftigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern neue Einblicke in die Signalgebung von humanen Makrophagen und sind von Bedeutung für das Verständnis der durch den P2X7-Rezeptor-vermittelten IL-1 β -Freisetzung. Im Bestreben, die Freisetzung von IL-1 β sowie damit verbundene Entzündungsreaktionen zu dämpfen, konzentrieren sich Forschungsansätze auf die Hemmung des NLRP3-Inflammasoms. Die vorliegende Arbeit offenbart jedoch, dass die Unterdrückung von NLRP3 oder Caspase-1 nicht zwangsläufig immer zu einer Reduktion der *in vivo* IL-1 β -Freisetzung führt, was die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Modulation von Entzündungsreaktionen erleichtern wird. Zur Behandlung von Erkrankungen, die durch IL-1 β vermittelt werden, kann daher weiterhin auf die therapeutische Neutralisierung von IL-1 β zurückgegriffen werden. Alternative Ansätze wie die Hemmung von HDAC6 durch niedermolekulare HDAC6-Inhibitoren oder die Blockade des P2X7-Rezeptors stellen des Weiteren potenziell vielversprechende Strategien dar.

5.2 Summary

Inflammation plays a pivotal role in the development of numerous diseases, encompassing both infectious and non-infectious conditions such as cancer, cardiovascular disorders, and diabetes. A primary mediator of inflammatory responses is the proinflammatory cytokine interleukin (IL)-1 β .

The current understanding of IL-1 β release involves a two-step model. The initial *priming* signal triggers the transcription and translation of the Pro-IL-1 β precursor, which can be induced, among other ways, through Toll-like receptor (TLR) activation. Subsequent signalling mediates the proteolytic cleavage of Pro-IL-1 β into active IL-1 β . P2X7 receptor stimulation is thought to serve as a second signal, triggering IL-1 β release through activation of the nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome in macrophages. This non-selective ion channel is activated by the endogenous ligand adenosine tetraphosphate (ATP) and its synthetic derivative 2,3-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP (BzATP). IL-1 β release is commonly studied in bone marrow-derived macrophages (BMDMs); however, human macrophages are rarely discussed. Understanding the mechanism of IL-1 β processing in human macrophages opens new possibilities for the treatment of inflammatory diseases. In the present work, human macrophages served as an *in vitro* model to study the underlying mechanism of P2X7-mediated IL-1 β release. THP-1 macrophages and U937 macrophages were used for this purpose. The optimal culture conditions for the differentiation of U937 monocyte-derived macrophages were established during this work, which led to the formation of cell-specific surface markers and resulted in an immune response to lipopolysaccharide (LPS).

In this study, a previously unrecognized mechanism of P2X7-receptor-mediated IL-1 β release in human macrophages is reported. Although activation of the P2X7-receptor by ATP and BzATP increased the release of IL-1 β in *primed* macrophages, the release was independent of the NLRP3 inflammasome. The NLRP3 inhibitor MCC950 (CRID3) failed to reduce BzATP-induced IL-1 β release in TLR2/1-*primed* macrophages. Notably, P2X7 receptor activation led to significant IL-1 β release in *primed* NLRP3-knockout-macrophages. Increasing extracellular K⁺ concentration or inhibiting caspase-1 or serine proteases which are associated with NLRP3 activation, maintained IL-1 β release by 50 %. The existence of two signalling pathways was highlighted, both inducing IL-1 β release post P2X7 receptor stimulation in TLR2/1-*primed* macrophages, independent of NLRP3 inflammasome activation. One signalling pathway is dependent on K⁺-efflux, caspase-1 and serine proteases, while the other pathway acts independently of K⁺-efflux, caspases and serine, cysteine and aspartate proteases. This suggests that previously unknown mechanisms are involved in the proteolytic processing of IL-1 β .

In the present work, *priming* was induced mainly via the TLR2/1 signalling pathway. However, it was confirmed that *priming* can also occur through other TLRs such as TLR2/6 or TLR4, and that activation of different TLRs distinguishes whether P2X7 receptor stimulation triggers NLRP3-dependent or

independent IL-1 β release. Future studies should further explore the involvement of TLR signalling pathways on NLRP3 inflammasome activation.

The second part of the study explored the immunomodulatory properties of the endogenous nucleotide adenosine tetraphosphate (Ap4), which is a derivative of ATP. It was demonstrated that Ap4 induced the release of bioactive IL-1 β in human macrophages. In further experiments, the involvement of different P2X receptors, in particular the P2X7 receptor, was investigated. The reversible P2X7 receptor antagonist A804598 did not affect Ap4-induced IL-1 β release. These results indicate that Ap4 mediates IL-1 β release independently of P2X7 receptor activation, despite structural similarities to ATP. Further studies corroborated this finding and showed that P2X7 receptor involvement in the Ap4-mediated response is unlikely. While stimulation of THP-1 macrophages with BzATP resulted in the formation of a 900 kDa membrane pore mediated by P2X7 receptor activation, this effect was absent upon stimulation with Ap4. Moreover, in contrast to BzATP, Ap4 did not induce calcium influx in P2X7-receptor-transfected HEK293 cells. However, prestimulation with Ap4 diminished BzATP-induced IL-1 β release. Thus, P2X7 receptor involvement is not entirely excluded, warranting further exploration of the potential Ap4-P2X7 receptor interaction.

Further studies show that Ap4 mediated the release of IL-1 β independently of K⁺-efflux and the NLRP3 inflammasome, highlighting the existence of an unknown NLRP3-independent mechanism for IL-1 β release in macrophages. Neither elevation of extracellular K⁺ concentration nor inhibition of the NLRP3 inflammasome affected the release of IL-1 β in response to Ap4 stimulation. Stimulation of *primed* NLRP3 knockout THP-1 macrophages resulted in significant IL-1 β release. In the presence of caspase, serine, cysteine and aspartate protease inhibitors, Ap4-induced IL-1 β release was unaffected. It is important to identify alternative mechanisms of Pro-IL-1 β processing to gain deeper understanding of the mechanisms involved.

Since Ap4-mediated calcium influx in THP-1 monocytes, which could be blocked by the G_{q/11}-inhibitor YM-254890, the involvement of metabotropic P2Y receptors is suggested in the Ap4-mediated response. Therefore, further studies should investigate the involvement of P2Y receptors on Ap4-induced IL-1 β release. In addition, the genome-wide expression profiles of ATP and Ap4 in macrophages were compared. Since Ap4, in contrast to ATP, significantly increased the expression of metallothioneins compared to control, further studies could test how the Ap4-mediated response is affected by inhibition of metallothioneins.

In the final part of the thesis, the involvement of histone deacetylase 6 (HDAC6) in IL-1 β release was investigated. HDAC6 has been linked to the assembly and activation of the NLRP3 inflammasome in mouse cells. To investigate the involvement of HDAC6 in NLRP3-mediated IL-1 β release in human macrophages, HDAC6 degradation was induced using the proteolysis targeting chimeras (PROTAC) strategy and its effect on IL-1 β release was investigated. Accordingly, the HDAC6 PROTAC LS-91,

which consists of the pan-HDAC inhibitor SAHA and the E3 ligase ligand thalidomide, and a control PROTAC (SLW118) that binds to HDAC6 but is unable to induce HDAC6 degradation, were used. LS-91, but not SLW118, reduced HDAC6 protein levels in THP-1 macrophages without affecting cell viability. IL-1 β release, however, decreased by both LS-91 and SLW118 in a concentration-dependent manner, suggesting that HDAC6 degradation is not necessary for inhibition of NLRP3-mediated IL-1 β release. It was found that inhibition of the catalytic domain by the HDAC inhibitor SAHA or the specific HDAC6 inhibitor tubastatin A was sufficient to reduce IL-1 β release. Therefore, the enzymatic activity of HDAC6 was shown to be critical for the function of the NLRP3 inflammasome. Since tubastatin A had no effect on IL-1 β release when added after TLR-mediated *priming*, the observed effects of HDAC6 inhibition on NLRP3-mediated inflammatory responses may be mechanistically due to its interaction with TLR signalling. To further corroborate this finding, the effects of small molecule HDAC6 inhibitors as well as thalidomide on *IL1B* gene expression or Pro-IL-1 β , caspase-1, NLRP3 and TNF protein levels in human macrophages should be further investigated in the future. Overall, the results suggest that HDAC6 inhibitors have potent anti-inflammatory effects and suppress the release of IL-1 β by human macrophages independent of NLRP3 oligomerisation and activation.

The investigations of this work on IL-1 β release in human macrophages clearly demonstrate the species-specific differences. Since NLRP3 and HDAC6 are differentially involved in human and mouse cells, studies in human primary cells or humanized mice should be considered to further investigate the role of IL-1 β signalling. The results provide new insights into human macrophage signalling and are of importance for understanding IL-1 β release mediated by the P2X7 receptor. To attenuate IL-1 β release and associated inflammatory responses, research approaches have focused on inhibiting the NLRP3 inflammasome. However, the present work reveals that suppression of NLRP3 or caspase-1 may not necessarily lead to a reduction in IL-1 β release *in vivo*, which will facilitate the development of novel therapeutic strategies to modulate inflammatory responses. Therapeutic neutralisation of IL-1 β remains a strategy for the treatment of diseases caused by IL-1 β . Alternative approaches such as inhibition of HDAC6 by small molecule HDAC6 inhibitors, or blockade of the P2X7 receptor also represent potentially promising strategies.

6. Literaturverzeichnis

1. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*. 1996;87(6):2095–2147. doi: 10.1182/blood.V87.6.2095.bloodjournal8762095.
2. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27(1):519–550. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612.
3. Jayaraman P, Sada-Ovalle I, Nishimura T, et al. IL-1 β Promotes Antimicrobial Immunity in Macrophages by Regulating TNFR Signaling and Caspase-3 Activation. *J Immunol*. 2013;190(8):4196–4204. doi: 10.4049/jimmunol.1202688.
4. Orzalli MH, Smith A, Jurado KA, Iwasaki A, Garlick JA, Kagan JC. An Antiviral Branch of the IL-1 Signaling Pathway Restricts Immune-Evasive Virus Replication. *Mol Cell*. 2018;71(5):825-840.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.009.
5. Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*. 2011;117(14):3720–3732. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417.
6. Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*. 2018;281(1):8–27. doi: 10.1111/imr.12621.
7. Ren K, Torres R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Res Rev*. 2009;60(1):57–64. doi: 10.1016/j.brainresrev.2008.12.020.
8. Sollberger G, Strittmatter GE, Garstkiewicz M, Sand J, Beer H-D. Caspase-1: The inflammasome and beyond. *Innate Immun*. 2014;20(2):115–125. doi: 10.1177/1753425913484374.
9. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2011;22(4):189–195. doi: 10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.
10. Makoni NJ, Nichols MR. The intricate biophysical puzzle of caspase-1 activation. *Arch Biochem Biophys*. 2021;699:108753. doi: 10.1016/j.abb.2021.108753.
11. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *J Exp Med*. 1986;163(6):1433–1450. doi: 10.1084/jem.163.6.1433.
12. Weber A, Wasiliew P, Kracht M. Interleukin-1 (IL-1) Pathway. *Sci Signal*. 2010;3(105):cm1. doi: 0.1126/scisignal.3105cm1.
13. Dinarello CA. A clinical perspective of IL-1 β as the gatekeeper of inflammation. *Eur J Immunol*. 2011;41(5):1203–1217. doi: 10.1002/eji.201141550.
14. Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13):3328. doi: 10.3390/ijms20133328.
15. Gros Lambert M, Py B. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res*. 2018;11:359–374. doi: 10.2147/JIR.S141220.

16. Man SM, Kanneganti T-D. Converging roles of caspases in inflammasome activation, cell death and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(1):7–21. doi: 10.1038/nri.2015.7.
17. Sharma D, Kanneganti T-D. The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *J Cell Biol*. 2016;213(6):617–629. doi: 10.1083/jcb.201602089.
18. Shao B-Z, Xu Z-Q, Han B-Z, Su D-F, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol*. 2015;6:202. doi: 10.3389/fphar.2015.00262.
19. Swanson KV, Deng M, Ting JP-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(8):477–489. doi: 10.1038/s41577-019-0165-0.
20. Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G. Cutting Edge: TNF- α Mediates Sensitization to ATP and Silica via the NLRP3 Inflammasome in the Absence of Microbial Stimulation. *J Immunol*. 2009;183(2):792–796. doi: 10.4049/jimmunol.0900173.
21. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, et al. NF- κ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *J Immunol*. 2009;183(2):787–791. doi: 10.4049/jimmunol.0901363.
22. Song N, Liu Z-S, Xue W, et al. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Mol Cell*. 2017;68(1):185-197.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2017.08.017.
23. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional Priming and Deubiquitination Regulate NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem*. 2012;287(43):36617–36622. doi: 10.1074/jbc.M112.407130.
24. Zhang Z, Meszaros G, He W, et al. Protein kinase D at the Golgi controls NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med*. 2017;214(9):2671–2693. doi: 10.1084/jem.20162040.
25. Viganò E, Diamond CE, Spreafico R, Balachander A, Sobota RM, Mortellaro A. Human caspase-4 and caspase-5 regulate the one-step non-canonical inflammasome activation in monocytes. *Nat Commun*. 2015;6(1):8761. doi: 10.1038/ncomms9761.
26. Gritsenko A, Yu S, Martin-Sanchez F, et al. Priming Is Dispensable for NLRP3 Inflammasome Activation in Human Monocytes In Vitro. *Front Immunol*. 2020;11:565924. doi: 10.3389/fimmu.2020.565924.
27. Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 β in monocytes and macrophages. *Blood*. 2009;113(10):2324–2335.
28. Lamkanfi M, Kanneganti T-D. Nlrp3: An immune sensor of cellular stress and infection. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(6):792–795. doi: 10.1016/j.biocel.2010.01.008.

29. Sorbara MT, Girardin SE. Mitochondrial ROS fuel the inflammasome. *Cell Res*. 2011;21(4):558–560. doi: 10.1038/cr.2011.20.
30. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*. 2013;38(6):1142–1153. doi: 10.1016/j.immuni.2013.05.016.
31. Katsnelson MA, Lozada-Soto KM, Russo HM, Miller BA, Dubyak GR. NLRP3 inflammasome signaling is activated by low-level lysosome disruption but inhibited by extensive lysosome disruption: roles for K⁺ efflux and Ca²⁺ influx. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2016;311(1):C83–C100. doi: 10.1152/ajpcell.00298.2015.
32. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ*. 2007;14(9):1583–1589. doi: 10.1038/sj.cdd.4402195.
33. Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol*. 2010;10(3):210–215. doi: 10.1038/nri2725.
34. Sharif H, Wang L, Wang WL, et al. Structural mechanism for NEK7-licensed activation of NLRP3 inflammasome. *Nature*. 2019;570(7761):338–343. doi: 10.1038/s41586-019-1295-z.
35. He Y, Zeng MY, Yang D, Motro B, Núñez G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature*. 2016;530(7590):354–357. doi: 10.1038/nature16959.
36. Vajjhala PR, Mirams RE, Hill JM. Multiple Binding Sites on the Pyrin Domain of ASC Protein Allow Self-association and Interaction with NLRP3 Protein. *J Biol Chem*. 2012;287(50):41732–41743. doi: 10.1074/jbc.M112.381228.
37. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature*. 2011;469(7329):221–225. doi: 10.1038/nature09663.
38. Iyer SS, He Q, Janczy JR, et al. Mitochondrial Cardiolipin Is Required for Nlrp3 Inflammasome Activation. *Immunity*. 2013;39(2):311–323. doi: 10.1016/j.immuni.2013.08.001.
39. Chen J, Chen ZJ. PtdIns4P on Dispersed Trans-Golgi Network Mediates NLRP3 Inflammasome Activation. *Nature*. 2018;546(7734):71–76. doi: 10.1038/s41586-018-0761-3.
40. Wu D, Zhang Z, Jiang X, Du Y, Zhang S, Yang X-D. Inflammasome Meets Centrosome: Understanding the Emerging Role of Centrosome in Controlling Inflammasome Activation. *Front Immunol*. 2022;13:826106. doi: 10.3389/fimmu.2022.826106.
41. Yang X, Li W, Zhang S, et al. PLK 4 deubiquitination by Spata2-CYLD suppresses NEK7-mediated NLRP3 inflammasome activation at the centrosome. *EMBO J*. 2020;39(2):e102201. doi: 10.15252/embj.2019102201.

42. Magupalli VG, Negro R, Tian Y, et al. HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. *Science*. 2020;369(6510):eaas8995. doi: 10.1126/science.aas8995.
43. Sun Q, Scott MJ. Caspase-1 as a multifunctional inflammatory mediator: noncytokine maturation roles. *J Leukoc Biol*. 2016;100(5):961–967. doi: 10.1189/jlb.3MR0516-224R.
44. Boucher D, Monteleone M, Coll RC, et al. Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *J Exp Med*. 2018;215(3):827–840. doi: 10.1084/jem.20172222.
45. Guey B, Petrilli V. Assessing Caspase-1 Activation. In: Di Virgilio F, Pelegrín P, editors. *NLR Proteins*. New York, NY: Springer New York; 2016. p. 197–206. doi: 10.1007/978-1-4939-3566-6_13.
46. Broz P, Von Moltke J, Jones JW, Vance RE, Monack DM. Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. *Cell Host Microbe*. 2010;8(6):471–483. doi: 10.1016/j.chom.2010.11.007.
47. Walker NPC, Talanian RV, Brady KD. Crystal Structure of the Cysteine Protease Interleukin-1 β -Converting Enzyme: A (p20/p10)₂ Homodimer. *Cell*. 1994;78:343–352.
48. Wilson KP, Black J-AF, Thomson JA, et al. Structure and mechanism of interleukin-1 β converting enzyme. *Nature*. 1994;370:270–274. doi: 10.1038/370270a0.
49. Romanowski MJ, Scheer JM, O'Brien T, McDowell RS. Crystal Structures of a Ligand-free and Malonate-Bound Human Caspase-1. *Structure*. 2004;12(8):1361–1371. doi: 10.1016/j.str.2004.05.010.
50. Man SM, Karki R, Kanneganti T-D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunol Rev*. 2017;277(1):61–75. doi: 10.1111/imr.12534.
51. Kayagaki N, Lee BL, Stowe IB, et al. IRF2 transcriptionally induces GSDMD expression for pyroptosis. *Sci Signal*. 2019;12(582):eaax4917. doi: 10.1126/scisignal.aax4917.
52. Kayagaki N, Warming S, Lamkanfi M, et al. Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature*. 2011;479(7371):117–121. doi: 10.1038/nature10558.
53. Wang K, Sun Q, Zhong X, et al. Structural Mechanism for GSDMD Targeting by Autoprocessed Caspases in Pyroptosis. *Cell*. 2020;180(5):941-955.e20. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.002.
54. Ding J, Wang K, Liu W, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*. 2016;535(7610):111–116. doi: 10.1038/nature18590.
55. Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. 2015;526(7575):660–665. doi: 10.1038/nature15514.

56. Kovacs SB, Miao EA. Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. *Trends Cell Biol.* 2017;27(9):673–684. doi: 10.1016/j.tcb.2017.05.005.
57. He W, Wan H, Hu L, et al. Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Res.* 2015;25(12):1285–1298. doi: 10.1038/cr.2015.139.
58. Rühl S, Shkarina K, Demarco B, Heilig R, Santos JC, Broz P. ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science.* 2018;362(6417):956–960. doi: 10.1126/science.aar7607.
59. Evavold CL, Ruan J, Tan Y, Xia S, Wu H, Kagan JC. The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity.* 2018;48(1):35-44.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2017.11.013.
60. Baker PJ, Boucher D, Bierschenk D, et al. NLRP3 inflammasome activation downstream of cytoplasmic LPS recognition by both caspase-4 and caspase-5: Innate immunity. *Eur J Immunol.* 2015;45(10):2918–2926. doi: 10.1002/eji.201545655.
61. Kaparakis-Liaskos M, Ferrero RL. Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(6):375–387. doi: 10.1038/nri3837.
62. Kayagaki N, Wong MT, Stowe IB, et al. Noncanonical Inflammasome Activation by Intracellular LPS Independent of TLR4. *Science.* 2013;341(6151):1246–1249. doi: 10.1126/science.1240248.
63. Casson CN, Yu J, Reyes VM, et al. Human caspase-4 mediates noncanonical inflammasome activation against gram-negative bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(21):6688–6693. doi: 10.1073/pnas.1421699112.
64. Shi J, Zhao Y, Wang Y, et al. Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature.* 2014;514(7521):187–192. doi: 10.1038/nature13683.
65. Kayagaki N, Stowe IB, Lee BL, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature.* 2015;526(7575):666–671. doi: 10.1038/nature15541.
66. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol.* 2015;6:422. doi: 10.3389/fimmu.2015.00422.
67. Christgen S, Place DE, Kanneganti T-D. Toward targeting inflammasomes: insights into their regulation and activation. *Cell Res.* 2020;30(4):315–327. doi: 10.1038/s41422-020-0295-8.
68. Murao A, Aziz M, Wang H, Brenner M, Wang P. Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis.* 2021;26(3–4):152–162. doi: 10.1007/s10495-021-01663-3.
69. North RA. Molecular Physiology of P2X Receptors. *Physiol Rev.* 2002;82(4):1013–1067. doi: 10.1152/physrev.00015.2002.
70. Di Virgilio F, Dal Ben D, Sarti AC, Giuliani AL, Falzoni S. The P2X7 Receptor in Infection and Inflammation. *Immunity.* 2017;47(1):15–31. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.020.

71. Vitiello L, Gorini S, Rosano G, La Sala A. Immunoregulation through extracellular nucleotides. *Blood*. 2012;120(3):511–518. doi: 10.1182/blood-2012-01-406496.
72. Chataigneau T, Lemoine D, Grutter T. Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. *Front Cell Neurosci*. 2013;7. doi: 10.3389/fncel.2013.00273.
73. Beamer E, Gölöncsér F, Horváth G, et al. Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology*. 2016;104:94–104. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.019.
74. Valera S, Hussy N, Evans RJ, et al. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2X receptor for extracellular ATP. *Nature*. Nature Publishing Group; 1994;371(6497):516–519. doi: 10.1038/371516a0.
75. Hattori M, Gouaux E. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature*. 2012;485(7397):207–212. doi: 10.1038/nature11010.
76. Von Kügelgen I, Wetter A. Molecular pharmacology of P2Y-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 2000;362(4–5):310–323. doi: 10.1007/s002100000310.
77. Lovászi M, Branco Haas C, Antonioli L, Pacher P, Haskó G. The role of P2Y receptors in regulating immunity and metabolism. *Biochem Pharmacol*. 2021;187:114419. doi: 10.1016/j.bcp.2021.114419.
78. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases. Page C, editor. *Pharmacol Rev*. 2019;71(3):345–382. doi: 10.1124/pr.117.014878.
79. Wilhelm K, Ganesan J, Müller T, et al. Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R. *Nat Med*. 2010;16(12):1434–1438. doi: 10.1038/nm.2242.
80. Donnelly-Roberts DL, Namovic MT, Han P, Jarvis MF. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *Br J Pharmacol*. 2009;157(7):1203–1214. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00233.x.
81. Müller CE, Namasivayam V. Recommended tool compounds and drugs for blocking P2X and P2Y receptors. *Purinergic Signal*. 2021;17(4):633–648. doi: 10.1007/s11302-021-09813-7.
82. Rat P, Olivier E, Tanter C, Wakx A, Dutot M. A fast and reproducible cell- and 96-well plate-based method for the evaluation of P2X7 receptor activation using YO-PRO-1 fluorescent dye. *J Biol Methods*. 2017;4(1):e64. doi: 10.14440/jbm.2017.136.
83. Virginio C, MacKenzie A, North RA, Surprenant A. Kinetics of cell lysis, dye uptake and permeability changes in cells expressing the rat P2X7 receptor. *J Physiol*. 1999;519(2):335–346. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.0335m.x.
84. Pelegrín P. Many ways to dilate the P2X7 receptor pore: P2X7 and dye uptake. *Br J Pharmacol*. 2011;163(5):908–911. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01325.x.

85. Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA. P2X7 Receptor Channels Allow Direct Permeation of Nanometer-Sized Dyes. *J Neurosci*. 2013;33(8):3557–3566. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2235-12.2013.
86. Virginio C, Church D, North RA, Surprenant A. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology*. 1997;36(9):1285–1294. doi: 10.1016/S0028-3908(97)00141-X.
87. Karasawa A, Michalski K, Mikhelzon P, Kawate T. The P2X7 receptor forms a dye-permeable pore independent of its intracellular domain but dependent on membrane lipid composition. *eLife*. 2017;6:e31186. doi: 10.7554/eLife.31186.
88. Marrian D. H. A new adenine nucleotide. *Biochim Biophys Acta*. 1954;13:278–281. doi: 10.1016/0006-3002(54)90314-5.
89. Lieberman I. Identification of Adenosine Tetraphosphate from Horse Muscle. *J Am Chem Soc*. 1955;77(12):3373–3375. doi: 10.1021/ja01617a064.
90. Small GD, Cooper C. Studies on the Occurrence and Biosynthesis of Adenosine Tetraphosphate. *Biochemistry*. 1966;5(1):26–33. doi: 10.1021/bi00865a004.
91. Lobaton CD, Vallejo CG, Sillero A, Sillero MAG. Diguanosinetetraphosphatase from Rat Liver: Activity on Diadenosine Tetraphosphate and Inhibition by Adenosine Tetraphosphate. *Eur J Biochem*. 1975;50(3):495–501. doi: 10.1111/j.1432-1033.1975.tb09888.x.
92. Van Dyke K, Robinson R, Urquilla P, et al. An Analysis of Nucleotides and Catecholamines in Bovine Medullary Granules by Anion Exchange High Pressure Liquid Chromatography and Fluorescence. *Pharmacology*. 1977;15(5):377–391. doi: 10.1159/000136714.
93. Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT, Pintor J. Adenosine 5′-tetraphosphate (Ap₄), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P₂ receptors. *R Go*. 2000;
94. Gualix J, Abal M, Pintor J, Miras-Portugal MT. Presence of ε-adenosine tetraphosphate in chromaffin granules after transport of ε-ATP. *FEBS Lett*. 1996;391(1–2):195–198. doi: 10.1016/0014-5793(96)00732-6.
95. Pintor J, Peláez T, Peral A. Adenosine Tetraphosphate, Ap₄, a Physiological Regulator of Intraocular Pressure in Normotensive Rabbit Eyes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308(2):468–473. doi: 10.1124/jpet.103.058669.
96. Westhoff T, Jankowski J, Schmidt S, et al. Identification and Characterization of Adenosine 5′-Tetraphosphate in Human Myocardial Tissue. *J Biol Chem*. 2003;278(20):17735–17740. doi: 10.1074/jbc.M300288200.
97. Tölle M, Jankowski V, Schuchardt M, et al. Adenosine 5′-Tetraphosphate Is a Highly Potent Purinergic Endothelium-Derived Vasoconstrictor. *Circ Res*. 2008;103(10):1100–1108. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.177865.

98. Kupriyanov VV, Ferretti JA, Balaban RS. Muscle adenylate kinase catalyzes adenosine 5'-tetraphosphate synthesis from ATP and ADP. *Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol.* 1986;869(1):107–111. doi: 10.1016/0167-4838(86)90316-X.
99. Luo GX, Nishimura JS. Adenosine 5'-tetraphosphate is synthesized by the histidine α 142-asparagine mutant of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J Biol Chem.* 1992;267(14):9516–9520. doi: 10.1016/S0021-9258(19)50121-1.
100. Amici A, Grolla AA, Del Grosso E, et al. Synthesis and Degradation of Adenosine 5'-Tetraphosphate by Nicotinamide and Nicotinate Phosphoribosyltransferases. *Cell Chem Biol.* 2017;24(5):553-564.e4. doi: 10.1016/j.chembiol.2017.03.010.
101. Fontes R. Acyl Coenzyme A Synthetase from *Pseudomonas fragi* Catalyzes the Synthesis of Adenosine 5'-Polyphosphates and Dinucleoside Polyphosphates. *J Bacteriol.* 1998;180(12):3152–3158. doi: 10.1128/jb.180.12.3152-3158.1998.
102. Guranowski A. Adenosine 5'-Tetraphosphate and Adenosine 5'-Pentaphosphate Are Synthesized by Yeast Acetyl Coenzyme A Synthetase. *J Bacteriol.* 1994;176(10):2986–2990. doi: 10.1128/jb.176.10.2986-2990.1994.
103. Guranowski A, Liu S. Adenosine 5'-tetraphosphate phosphohydrolase activity is an inherent property of soluble exopolyphosphatase from yeast. 1998;1380(2):232–238. doi: 10.1016/s0304-4165(97)00147-5.
104. Ortiz B, Sillero A, Gunther Sillero MA. Specific synthesis of adenosine(5')tetraphospho(5')nucleoside and adenosine(5')oligophospho(5')adenosine ($n > 4$) catalyzed by firefly luciferase. *Eur J Biochem.* 1993;212(1):263–270. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17658.x.
105. Madrid O, Martín D, Atencia EA, Sillero A, Günther Sillero MA. T4 DNA ligase synthesizes dinucleoside polyphosphates. *FEBS Lett.* 1998;433(3):283–286. doi: 10.1016/S0014-5793(98)00932-6.
106. Guranowski A. Metabolism of diadenosine tetraphosphate (Ap₄A) and related nucleotides in plants; review with historical and general perspective. *Front Biosci.* 2004;9(1–3):1398. doi: 10.2741/1338.
107. Mateo J, Miras-Portugal MT, Rotllan P. Ecto-enzymatic hydrolysis of diadenosine polyphosphates by cultured adrenomedullary vascular endothelial cells. *Am J Physiol-Cell Physiol.* 1997;273(3):C918–C927. doi: 10.1152/ajpcell.1997.273.3.C918.
108. Zimmermann H. Extracellular purine metabolism. *Drug Dev Res.* 1996;39(3–4):337–352. doi: 10.1002/(SICI)1098-2299(199611/12)39:3/4<337::AID-DDR15>3.0.CO;2-Z.

109. Verheyden DLM, Wehrli WE, Moffatt JG. Dismutation Reactions of Nucleoside Polyphosphates. I. General Features of the Reaction. *J Am Chem Soc.* 1965;87(10):2257–2265. doi: 10.1021/ja01088a027.
110. Guranowski A, Starzynska E, Pietrowska-Borek M, et al. Methylene analogues of adenosine 5'-tetraphosphate. Their chemical synthesis and recognition by human and plant mononucleoside tetraphosphatases and dinucleoside tetraphosphatases. *FEBS J.* 2006;273(4):829–838. doi: 10.1111/j.1742-4658.2006.05115.x.
111. Bailey SJ, Hourani SMO. Effects of suramin on contractions of the guinea-pig vas deferens induced by analogues of adenosine 5'-triphosphate. *Br J Pharmacol.* 1995;114(6):1125–1132. doi: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb13324.x.
112. Lewis CJ, Gitterman DP. Effects of diadenosine polyphosphates (Ap_nAs) and adenosine polyphospho guanosines (Ap_nGs) on rat mesenteric artery P2X receptor ion channels. *Br J Pharmacol.* 2000;129(1):124–130. doi: 10.1038/sj.bjp.0702993.
113. Jones CA, Chessell IP, Simon J, et al. Functional characterization of the P2X₄ receptor orthologues: Mouse P2X₄ receptors. *Br J Pharmacol.* 2000;129(2):388–394. doi: 10.1038/sj.bjp.0703059.
114. Gómez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT, Pintor J. Adenosine 5'-tetraphosphate (Ap₄), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors. *Neuropharmacology.* 2000;39(12):2381–2390. doi: 10.1016/S0028-3908(00)00070-8.
115. Di Virgilio F. Liaisons dangereuses: P2X₇ and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28(9):465–472. doi: 10.1016/j.tips.2007.07.002.
116. Latz E, Duewell P. NLRP3 inflammasome activation in inflammaging. *Semin Immunol.* 2018;40:61–73. doi: 10.1016/j.smim.2018.09.001.
117. Sepe V, Libetta C, Gregorini M, Rampino T. The innate immune system in human kidney inflammaging. *J Nephrol.* 2022;35(2):381–395. doi: 10.1007/s40620-021-01153-4.
118. Herrmann J, Xia M, Gummi MR, et al. Stressor-Induced “Inflammaging” of Vascular Smooth Muscle Cells via Nlrp3-Mediated Pro-inflammatory Auto-Loop. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:752305. doi: 10.3389/fcvm.2021.752305.
119. Franceschi C, Bonafè M, Valensin S, et al. Inflamm-aging: An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;908(1):244–254. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x.
120. Mihai S, Codrici E, Popescu ID, et al. Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome. *J Immunol Res.* 2018;2018:2180373. doi: 10.1155/2018/2180373.

121. Wen C, Yang X, Yan Z, et al. Nalp3 inflammasome is activated and required for vascular smooth muscle cell calcification. *Int J Cardiol.* 2013;168(3):2242–2247. doi: 10.1016/j.ijcard.2013.01.211.
122. Hegner B, Schaub T, Janke D, et al. Targeting proinflammatory cytokines ameliorates calcifying phenotype conversion of vascular progenitors under uremic conditions in vitro. *Sci Rep.* 2018;8(1):12087. doi: 10.1038/s41598-018-30626-z.
123. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(12):1119–1131. doi: 10.1056/NEJMoa1707914.
124. Moe SM, Chen NX. Mechanisms of Vascular Calcification in Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(2):213–216. doi: 10.1681/ASN.2007080854.
125. Mizobuchi M, Towler D, Slatopolsky E. Vascular Calcification: The Killer of Patients with Chronic Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(7):1453–1464. doi: 10.1681/ASN.2008070692.
126. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(6):1048–1056. doi: 10.1093/ndt/gfh813.
127. Baigent C, Burbury K, Wheeler D. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure. *The Lancet.* 2000;356(9224):147–152. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02456-9.
128. Tölle M, Henkel C, Herrmann J, et al. Uremic mouse model to study vascular calcification and “inflamm-aging.” *J Mol Med.* 2022;100(9):1321–1330. doi: 10.1007/s00109-022-02234-y.
129. Tölle M, Reshetnik A, Schuchardt M, Höhne M, Van Der Giet M. Arteriosclerosis and vascular calcification: causes, clinical assessment and therapy. *Eur J Clin Invest.* 2015;45(9):976–985. doi: 10.1111/eci.12493.
130. Lanzer P, Hannan FM, Lanzer JD, et al. Medial Arterial Calcification. *J Am Coll Cardiol.* 2021;78(11):1145–1165. doi: 10.1016/j.jacc.2021.06.049.
131. Hillman KA, Burnstock G, Unwin RJ. The P2X₇ ATP Receptor in the Kidney: A Matter of Life or Death? *Nephron Exp Nephrol.* 2005;101(1):e24–e30. doi: 10.1159/000086036.
132. Menzies RI, Booth JWR, Mullins JJ, et al. Hyperglycemia-induced Renal P2X₇ Receptor Activation Enhances Diabetes-related Injury. *EBioMedicine.* 2017;19:73–83. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.04.011.
133. Schwiebert EM, Wallace DP, Braunstein GM, et al. Autocrine extracellular purinergic signaling in epithelial cells derived from polycystic kidneys. *Am J Physiol-Ren Physiol.* 2002;282(4):F763–F775. doi: 10.1152/ajprenal.0337.2000.

134. Maynard JP, Sfanos KS. P2 purinergic receptor dysregulation in urologic disease. *Purinergic Signal*. 2022;18(3):267–287. doi: 10.1007/s11302-022-09875-1.
135. Qian Y, Qian C, Xie K, et al. P2X7 receptor signaling promotes inflammation in renal parenchymal cells suffering from ischemia-reperfusion injury. *Cell Death Dis*. 2021;12(1):132. doi: 10.1038/s41419-020-03384-y.
136. Peserico A, Simone C. Physical and Functional HAT/HDAC Interplay Regulates Protein Acetylation Balance. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:371832. doi: 10.1155/2011/371832.
137. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature*. 2000;403(6765):41–24. doi: 10.1038/47412.
138. Seidel C, Schnekenburger M, Dicato M, Diederich M. Histone deacetylase 6 in health and disease. *Epigenomics*. 2015;7(1):103–118. doi: 10.2217/epi.14.69.
139. Verdel A, Curtet S, Brocard M-P, et al. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr Biol*. 2000;10(12):747–749. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00542-X.
140. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet*. 2009;10(1):32–42. doi: 10.1038/nrg2485.
141. Park S-Y, Kim J-S. A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp Mol Med*. 2020;52(2):204–212. doi: 10.1038/s12276-020-0382-4.
142. Miyake Y, Keusch JJ, Wang L, et al. Structural insights into HDAC6 tubulin deacetylation and its selective inhibition. *Nat Chem Biol*. 2016;12(9):748–754. doi: 10.1038/nchembio.2140.
143. Hai Y, Christianson DW. Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition. *Nat Chem Biol*. 2016;12(9):741–747. doi: 10.1038/nchembio.2134.
144. Ouyang H, Ali YO, Ravichandran M, et al. Protein Aggregates Are Recruited to Aggresome by Histone Deacetylase 6 via Unanchored Ubiquitin C Termini. *J Biol Chem*. 2012;287(4):2317–2327. doi: 10.1074/jbc.M111.273730.
145. Li G, Jiang H, Chang M, Xie H, Hu L. HDAC6 α -tubulin deacetylase: A potential therapeutic target in neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*. 2011;304(1–2):1–8. doi: 10.1016/j.jns.2011.02.017.
146. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*. 2002;417(6887):455–458. doi: 10.1038/417455a.
147. Kaluza D, Kroll J, Gesierich S, et al. Class IIb HDAC6 regulates endothelial cell migration and angiogenesis by deacetylation of cortactin: HDAC6 and angiogenesis. *EMBO J*. 2011;30(20):4142–4156. doi: 10.1038/emboj.2011.298.

148. Zhang X, Yuan Z, Zhang Y, et al. HDAC6 Modulates Cell Motility by Altering the Acetylation Level of Cortactin. *Mol Cell*. 2007;27(2):197–213. doi: 10.1016/j.molcel.2007.05.033.
149. Boyault C, Sadoul K, Pabion M, Khochbin S. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene*. 2007;26(37):5468–5476. doi: 10.1038/sj.onc.1210614.
150. Kovacs JJ, Murphy PJM, Gaillard S, et al. HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Mol Cell*. 2005;18(5):601–607. doi: 10.1016/j.molcel.2005.04.021.
151. Brindisi M, Saraswati AP, Brogi S, Gemma S, Butini S, Campiani G. Old but Gold: Tracking the New Guise of Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Enzyme as a Biomarker and Therapeutic Target in Rare Diseases. *J Med Chem*. 2020;63(1):23–39. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00924.
152. Li Y, Shin D, Kwon SH. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS J*. 2013;280(3):775–793. doi: 10.1111/febs.12079.
153. Kerr E, Holohan C, McLaughlin KM, et al. Identification of an acetylation-dependant Ku70/FLIP complex that regulates FLIP expression and HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cell Death Differ*. 2012;19(8):1317–1327. doi: 10.1038/cdd.2012.8.
154. Osko JD, Christianson DW. Structural Basis of Catalysis and Inhibition of HDAC6 CD1, the Enigmatic Catalytic Domain of Histone Deacetylase 6. *Biochemistry*. 2019;58(49):4912–4924. doi: 10.1021/acs.biochem.9b00934.
155. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao T-P. The Deacetylase HDAC6 Regulates Aggresome Formation and Cell Viability in Response to Misfolded Protein Stress. *Cell*. 2003;115(6):727–738. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00939-5.
156. Hao R, Nanduri P, Rao Y, et al. Proteasomes Activate Aggresome Disassembly and Clearance by Producing Unanchored Ubiquitin Chains. *Mol Cell*. 2013;51(6):819–828. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.016.
157. Hyttinen JMT, Amadio M, Viiri J, Pascale A, Salminen A, Kaarniranta K. Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Res Rev*. 2014;18:16–28. doi: 10.1016/j.arr.2014.07.002.
158. Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, et al. HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature*. 2007;447(7146):860–864. doi: 10.1038/nature05853.
159. Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. 2000;10(12):524–530. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01852-3.
160. Wang X-X, Wan R-Z, Liu Z-P. Recent advances in the discovery of potent and selective HDAC6 inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2018;143:1406–1418. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.10.040.

161. Pulya S, Amin SkA, Adhikari N, Biswas S, Jha T, Ghosh B. HDAC6 as privileged target in drug discovery: A perspective. *Pharmacol Res.* 2021;163:105274. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105274.
162. Aldana-Masangkay GI, Sakamoto KM. The Role of HDAC6 in Cancer. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:1–10. doi: 10.1155/2011/875824.
163. Moreno-Gonzalo O, Mayor F, Sánchez-Madrid F. HDAC6 at Crossroads of Infection and Innate Immunity. *Trends Immunol.* 2018;39(8):591–595. doi: 10.1016/j.it.2018.05.004.
164. Fukada M, Hanai A, Nakayama A, et al. Loss of Deacetylation Activity of Hdac6 Affects Emotional Behavior in Mice. Hashimoto K, editor. *PLoS ONE.* 2012;7(2):e30924. doi: 10.1371/journal.pone.0030924.
165. Ran J, Zhou J. Targeted inhibition of histone deacetylase 6 in inflammatory diseases. *Thorac Cancer.* 2019;10(3):405–412. doi: 10.1111/1759-7714.12974.
166. Falkenberg KJ, Johnstone RW. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(9):673–691. doi: 10.1038/nrd4360.
167. Kalin JH, Bergman JA. Development and Therapeutic Implications of Selective Histone Deacetylase 6 Inhibitors. *J Med Chem.* 2013;56(16):6297–6313. doi: 10.1021/jm4001659.
168. Wang P, Wang Z, Liu J. Role of HDACs in normal and malignant hematopoiesis. *Mol Cancer.* 2020;19(1):5. doi: 10.1186/s12943-019-1127-7.
169. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(10):a026831. doi: 10.1101/cshperspect.a026831.
170. Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene.* 2007;26(37):5420–5432. doi: 10.1038/sj.onc.1210610.
171. Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *The Oncologist.* 2007;12(10):1247–1252. doi: 10.1634/theoncologist.12-10-1247.
172. Bertrand P. Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2010;45(6):2095–2116. doi: 10.1016/j.ejmech.2010.02.030.
173. Jochems J, Boulden J, Lee BG, et al. Antidepressant-Like Properties of Novel HDAC6-Selective Inhibitors with Improved Brain Bioavailability. *Neuropsychopharmacology.* 2014;39(2):389–400. doi: 10.1038/npp.2013.207.
174. Shen S, Svoboda M, Zhang G, et al. Structural and in Vivo Characterization of Tubastatin A, a Widely Used Histone Deacetylase 6 Inhibitor. *ACS Med Chem Lett.* 2020;11(5):706–712. doi: 10.1021/acsmchemlett.9b00560.

175. Yue K, Sun S, Jia G, et al. First-in-Class Hydrazide-Based HDAC6 Selective Inhibitor with Potent Oral Anti-Inflammatory Activity by Attenuating NLRP3 Inflammasome Activation. *J Med Chem*. 2022;65(18):12140–12162. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c00853.
176. Selenica M-L, Benner L, Housley SB, et al. Histone deacetylase 6 inhibition improves memory and reduces total tau levels in a mouse model of tau deposition. *Alzheimers Res Ther*. 2014;6(1):12. doi: 10.1186/alzrt241.
177. Chang P, Li H, Hu H, Li Y, Wang T. The Role of HDAC6 in Autophagy and NLRP3 Inflammasome. *Front Immunol*. 2021;12:763831. doi: 10.3389/fimmu.2021.763831.
178. Cao Z, Gu Z, Lin S, et al. Attenuation of NLRP3 Inflammasome Activation by Indirubin-Derived PROTAC Targeting HDAC6. *ACS Chem Biol*. 2021;16(12):2746–2751. doi: 10.1021/acscchembio.1c00681.
179. Duong BH, Onizawa M, Osés-Prieto JA, et al. A20 Restricts Ubiquitination of Pro-Interleukin-1 β Protein Complexes and Suppresses NLRP3 Inflammasome Activity. *Immunity*. 2015;42(1):55–67. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.031.
180. Rodgers MA, Bowman JW, Fujita H, et al. The linear ubiquitin assembly complex (LUBAC) is essential for NLRP3 inflammasome activation. *J Exp Med*. 2014;211(7):1333–1347. doi: 10.1084/jem.20132486.
181. Guan K, Wei C, Zheng Z, et al. MAVS Promotes Inflammasome Activation by Targeting ASC for K63-Linked Ubiquitination via the E3 Ligase TRAF3. *J Immunol*. 2015;194(10):4880–4890. doi: 10.4049/jimmunol.1402851.
182. Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, et al. Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol*. 2012;13(3):255–263. doi: 10.1038/ni.2215.
183. Hwang I, Lee E, Jeon S-A, Yu J-W. Histone deacetylase 6 negatively regulates NLRP3 inflammasome activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;467(4):973–978. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.033.
184. Yang K, Wu H, Zhang Z, et al. Development of Selective Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Degraders Recruiting Von Hippel–Lindau (VHL) E3 Ubiquitin Ligase. *ACS Med Chem Lett*. 2020;11(4):575–581. doi: 10.1021/acsmchemlett.0c00046.
185. Lai AC, Crews CM. Induced protein degradation: an emerging drug discovery paradigm. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(2):101–114. doi: 10.1038/nrd.2016.211.
186. Burslem GM, Crews CM. Proteolysis-Targeting Chimeras as Therapeutics and Tools for Biological Discovery. *Cell*. 2020;181(1):102–114. doi: 10.1016/j.cell.2019.11.031.
187. Nalawansa DA, Crews CM. PROTACs: An Emerging Therapeutic Modality in Precision Medicine. *Cell Chem Biol*. 2020;27(8):998–1014. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.07.020.

188. Neklesa TK, Winkler JD, Crews CM. Targeted protein degradation by PROTACs. *Pharmacol Ther.* 2017;174:138–144. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.02.027.
189. Paiva S-L, Crews CM. Targeted protein degradation: elements of PROTAC design. *Curr Opin Chem Biol.* 2019;50:111–119. doi: 10.1016/j.cbpa.2019.02.022.
190. Sun X, Gao H, Yang Y, et al. PROTACs: great opportunities for academia and industry. *Signal Transduct Target Ther.* 2019;4(1):64. doi: 10.1038/s41392-019-0101-6.
191. Békés M, Langley DR, Crews CM. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue. *Nat Rev Drug Discov.* 2022;21(3):181–200. doi: 10.1038/s41573-021-00371-6.
192. Zeng S, Huang W, Zheng X, et al. Proteolysis targeting chimera (PROTAC) in drug discovery paradigm: Recent progress and future challenges. *Eur J Med Chem.* 2021;210:112981. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112981.
193. Li W, Elhassan RM, Hou X, Fang H. Recent Advances in Small Molecule PROTACs for the Treatment of Cancer. *Curr Med Chem.* 2021;28(24):4893–4909. doi: 10.2174/0929867327666201117141611.
194. Chamberlain PP, Hamann LG. Development of targeted protein degradation therapeutics. *Nat Chem Biol.* 2019;15(10):937–944. doi: 10.1038/s41589-019-0362-y.
195. Mullard A. Targeted protein degraders crowd into the clinic. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20(4):247–250. doi: 10.1038/d41573-021-00052-4.
196. NCT04072952. A Phase 1/2 Trial of ARV-471 Alone and in Combination With Palbociclib (IBRANCE®) in Patients With ER+/HER2- Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer (mBC). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04072952?term=NCT04072952&rank=1>. Accessed August 14, 2023.
197. NCT05654623. A Study to Learn About a New Medicine Called ARV-471 (PF-07850327) in People Who Have Advanced Metastatic Breast Cancer. (VERITAC-2). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05654623?term=NCT05654623&rank=1>. Accessed August 14, 2023.
198. NCT03888612. Trial of ARV-110 in Patients With Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer (mCRPC). <https://clinicaltrials.gov/study/NCT03888612?term=NCT03888612&rank=1>. Accessed August 14, 2023.
199. Yang K, Song Y, Xie H, et al. Development of the first small molecule histone deacetylase 6 (HDAC6) degraders. *Bioorg Med Chem Lett.* 2018;28(14):2493–2497. doi: 10.1016/j.bmcl.2018.05.057.
200. An Z, Lv W, Su S, Wu W, Rao Y. Developing potent PROTACs tools for selective degradation of HDAC6 protein. *Protein Cell.* 2019;10(8):606–609. doi: 10.1007/s13238-018-0602-z.

201. Yang H, Lv W, He M, et al. Plasticity in designing PROTACs for selective and potent degradation of HDAC6. *Chem Commun.* 2019;55(98):14848–14851. doi: 10.1039/C9CC08509B.
202. Yang K, Zhao Y, Nie X, et al. A Cell-Based Target Engagement Assay for the Identification of Cereblon E3 Ubiquitin Ligase Ligands and Their Application in HDAC6 Degraders. *Cell Chem Biol.* 2020;27(7):866-876.e8. doi: 10.1016/j.chembiol.2020.04.008.
203. Sinatra L, Yang J, Schliehe-Diecks J, et al. Solid-Phase Synthesis of Cereblon-Recruiting Selective Histone Deacetylase 6 Degraders (HDAC6 PROTACs) with Antileukemic Activity. *J Med Chem.* 2022;65(24):16860–16878. doi: 10.1021/acs.jmedchem.2c01659.
204. Mori T, Ito T, Liu S, et al. Structural basis of thalidomide enantiomer binding to cereblon. *Sci Rep.* 2018;8(1):1294. doi: 10.1038/s41598-018-19202-7.
205. Buhimschi AD, Armstrong HA, Toure M, et al. Targeting the C481S Ibrutinib-Resistance Mutation in Bruton's Tyrosine Kinase Using PROTAC-Mediated Degradation. *Biochemistry.* 2018;57(26):3564–3575. doi: 10.1021/acs.biochem.8b00391.
206. Bricej A, Steinebach C, Kuchta R, Gütschow M, Sosič I. E3 Ligase Ligands in Successful PROTACs: An Overview of Syntheses and Linker Attachment Points. *Front Chem.* 2021;9:707317. doi: 10.3389/fchem.2021.707317.
207. Bockstiegel J, Wurnig SL, Engelhardt J, Enns J, Hansen FK, Weindl G. Pharmacological inhibition of HDAC6 suppresses NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β release. *Biochem Pharmacol.* 2023;215:115693. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115693.
208. Gediya LK, Chopra P, Purushottamachar P, Maheshwari N, Njar VCO. A New Simple and High-Yield Synthesis of Suberoylanilide Hydroxamic Acid and Its Inhibitory Effect Alone or in Combination with Retinoids on Proliferation of Human Prostate Cancer Cells. *J Med Chem.* 2005;48(15):5047–5051. doi: 10.1021/jm058214k.
209. Lindner S, Steinebach C, Kehm H, Mangold M, Gütschow M, Krönke J. Chemical Inactivation of the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon by Pomalidomide-based Homo-PROTACs. *J Vis Exp.* 2019;(147):59472. doi: 10.3791/59472.
210. Invivogen. THP1-KO-NLRP3 Cells. Tech Datasheet. (Version 22J14-AK).
211. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer.* 1976;17(5):565–577. doi: 10.1002/ijc.2910170504.
212. Nascimento CR, Rodrigues Fernandes NA, Gonzalez Maldonado LA, Rossa Junior C. Comparison of monocytic cell lines U937 and THP-1 as macrophage models for in vitro studies. *Biochem Biophys Rep.* 2022;32:101383. doi: 10.1016/j.bbrep.2022.101383.

213. Chanput W, Peters V, Wichers H. THP-1 and U937 Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, et al., editors. *Impact Food Bioact Health*. Cham (CH): Springer International Publishing; 2015. p. 147–159. doi: 10.1007/978-3-319-16104-4_14.
214. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol*. 2014;23(1):37–45. doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.
215. Russell WC, Graham FL, Smiley J, Nairn R. Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol*. 1977;36(1):59–72. doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
216. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(16):7297–7301. doi: 10.1073/pnas.92.16.7297.
217. Longo PA, Kavran JM, Kim M-S, Leahy DJ. Transient Mammalian Cell Transfection with Polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol*. Elsevier; 2013. p. 227–240. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5.
218. Invivogen. HEK-Blue™ IL-1β Cells. Tech Datasheet. (Version 21A11-NJ).
219. Milteny Biotech. MACSPlex Cytokine 12 Kit human. Technical Datasheet.
220. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184(1):39–51. doi: 10.1016/0022-1759(95)00072-I.
221. BioLegend. Zombie Aqua Fixable Viability Kit. Tech Datasheet. (Version 8).
222. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol*. 2015;111(1). doi: 10.1002/0471142735.ima03bs111.
223. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):469–471. doi: 10.1101/pdb.prot095505.
224. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018;2018(6):465–468. doi: 10.1101/pdb.prot095497.
225. Gan SD, Patel KR. Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Invest Dermatol*. 2013;133(9):1–3. doi: 10.1038/jid.2013.287.
226. Yang P-C, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North Am J Med Sci*. 2012;4(9):429. doi: 10.4103/1947-2714.100998.
227. Ladner CL, Yang J, Turner RJ, Edwards RA. Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem*. 2004;326(1):13–20. doi: 10.1016/j.ab.2003.10.047.

228. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150(1):76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
229. Kurien BT, Scofield RH. Western Blotting: An Introduction. In: Kurien BT, Scofield RH, editors. *West Blotting*. New York (US): Springer New York; 2015. p. 17–30. doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7_5.
230. Mullis K B, Faloona F A. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335–350. doi: doi: 10.1016/0076-6879(87)55023-6.
231. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005;5(2):209–219. doi: 10.1586/14737159.5.2.209.
232. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
233. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009;10(1):57–63. doi: 10.1038/nrg2484.
234. McDermaid A, Monier B, Zhao J, Liu B, Ma Q. Interpretation of differential gene expression results of RNA-seq data: review and integration. *Brief Bioinform.* 2019;20(6):2044–2054. doi: 10.1093/bib/bby067.
235. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnetjournal.* 2011;17(1):10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200.
236. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics.* 2013;29(1):15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
237. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* 2014;30(7):923–930. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656.
238. R: The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>. Accessed May 16, 2023.
239. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
240. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods.* 2015;12(2):115–121. doi: 10.1038/nmeth.3252.
241. Wickham H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York (US): Springer New York; 2009. doi: 10.1007/978-0-387-98141-3.
242. Wu T, Hu E, Xu S, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *The Innovation.* 2021;2(3):100141. doi: 10.1016/j.xinn.2021.100141.

243. Di Virgilio F, Jiang L-H, Roger S, et al. Structure, function and techniques of investigation of the P2X7 receptor (P2X7R) in mammalian cells. *Methods Enzymol.* Elsevier; 2019. p. 115–150. doi: 10.1016/bs.mie.2019.07.043.
244. Gee KR, Brown KA, Chen W-NU, Bishop-Stewart J, Gray D, Johnson I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium.* 2000;27(2):97–106. doi: 10.1054/ceca.1999.0095.
245. Li Y, Yan Y, Liu F, Wang M, Feng F, Xiao Y. Effects of calcium Ionophore A23187 on the apoptosis of hepatic stellate cells stimulated by transforming growth factor- β 1. *Cell Mol Biol Lett.* 2018;23(1):1. doi: 10.1186/s11658-017-0063-z.
246. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(2):99–109. doi: 10.1038/nrmicro2070.
247. Bockstiegel J, Eneghardt J, Weindl G. P2X7 receptor activation leads to NLRP3-independent IL 1 β release by human macrophages. *Cell Commun Signal.* accepted; doi: 10.1186/s12964-023-01356-1.
248. Karasawa A, Kawate T. Structural basis for subtype-specific inhibition of the P2X7 receptor. *eLife.* 2016;5:e22153. doi: 10.7554/eLife.22153.
249. Murgia M, Hanau S, Pizzo P, Rippa M, Di Virgilio F. Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *J Biol Chem.* 1993;268(11):8199–8203. doi: 10.1016/S0021-9258(18)53082-9.
250. De Rivero Vaccari JP, Bastien D, Yurcisin G, et al. P2X₄ Receptors Influence Inflammasome Activation after Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2012;32(9):3058–3066. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4930-11.2012.
251. Gicquel T, Robert S, Loyer P, et al. IL-1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages. *FASEB J.* 2015;29(10):4162–4173. doi: 10.1096/fj.14-267393.
252. Balázs B, Dankó T, Kovács G, Köles L, Hediger MA, Zsembery Á. Investigation of the Inhibitory Effects of the Benzodiazepine Derivative, 5-BDBD on P2X₄ Purinergic Receptors by two Complementary Methods. *Cell Physiol Biochem.* 2013;32(1):11–24. doi: 10.1159/000350119.
253. Michel AD, Clay WC, Ng SW, et al. Identification of regions of the P2X₇ receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects: Receptor regions affecting P2X₇ antagonist potency. *Br J Pharmacol.* 2008;155(5):738–751. doi: 10.1038/bjp.2008.306.
254. Huo H, Fryatt AG, Farmer LK, Schmid R, Evans RJ. Mapping the binding site of the P2X receptor antagonist PPADS reveals the importance of orthosteric site charge and the cysteine-rich head region. *J Biol Chem.* 2018;293(33):12820–12831. doi: 10.1074/jbc.RA118.003737.

255. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Wu J, et al. Anti-inflammatory Compounds Parthenolide and Bay 11-7082 Are Direct Inhibitors of the Inflammasome. *J Biol Chem*. 2010;285(13):9792–9802. doi: 10.1074/jbc.M109.082305.
256. Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med*. 2015;21(3):248–255. doi: 10.1038/nm.3806.
257. Lu A, Magupalli VG, Ruan J, et al. Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC-Dependent Inflammasomes. *Cell*. 2014;156(6):1193–1206. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.008.
258. Provoost S, Maes T, Pauwels NS, et al. NLRP3/Caspase-1–Independent IL-1 β Production Mediates Diesel Exhaust Particle-Induced Pulmonary Inflammation. *J Immunol*. 2011;187(6):3331–3337. doi: 10.4049/jimmunol.1004062.
259. He Y, Franchi L, Núñez G. TLR Agonists Stimulate Nlrp3-Dependent IL-1 β Production Independently of the Purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and In Vivo. *J Immunol*. 2013;190(1):334–339. doi: 10.4049/jimmunol.1202737.
260. Layhadi J, Fountain S. P2X4 Receptor-Dependent Ca²⁺ Influx in Model Human Monocytes and Macrophages. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11):2261. doi: 10.3390/ijms18112261.
261. Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, et al. A Novel G α q/11-selective Inhibitor. *J Biol Chem*. 2004;279(46):47438–47445. doi: 10.1074/jbc.M408846200.
262. Surprenant A, North RA. Signaling at Purinergic P2X Receptors. *Annu Rev Physiol*. 2009;71(1):333–359. doi: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100630.
263. Hazuda DJ, Strickler J, Kueppers F, Simon PL, Young PR. Processing of precursor interleukin-1 β and inflammatory disease. *J Biol Chem*. 1990;265(11):6318–6322. doi: 10.1016/S0021-9258(19)39328-7.
264. Rots NY, Iavarone A, Bromleigh V, Freedman LP. Induced Differentiation of U937 Cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3 Involves Cell Cycle Arrest in G1 That Is Preceded by a Transient Proliferative Burst and an Increase in Cyclin Expression. *Blood*. 1999;93(8):2721–2729. doi: 10.1182/blood.V93.8.2721.
265. García A, Serrano A, Abril E, et al. Differential effect on U937 cell differentiation by targeting transcriptional factors implicated in tissue- or stage-specific induced integrin expression. *Exp Hematol*. 1999;27(2):353–364. doi: 10.1016/S0301-472X(98)00038-1.
266. Song M, Ryoo I, Choi H, et al. NRF2 Signaling Negatively Regulates Phorbol-12-Myristate-13-Acetate (PMA)-Induced Differentiation of Human Monocytic U937 Cells into Pro-Inflammatory Macrophages. Cignarella A, editor. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0134235. doi: 10.1371/journal.pone.0134235.

267. Passmore JS, Lukey PT, Ress SR. The human macrophage cell line U937 as an in vitro model for selective evaluation of mycobacterial antigen-specific cytotoxic T-cell function. *Immunology*. 2001;102(2):146–156. doi: 10.1046/j.1365-2567.2001.01164.x.
268. Tamura K, Ishikawa G, Yoshie M, et al. Glibenclamide inhibits NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β secretion in human trophoblasts. *J Pharmacol Sci*. 2017;135(2):89–95. doi: 10.1016/j.jphs.2017.09.032.
269. McDade JK, Brennan-Pierce EP, Ariganello MB, Labow RS, Michael Lee J. Interactions of U937 macrophage-like cells with decellularized pericardial matrix materials: Influence of crosslinking treatment. *Acta Biomater*. 2013;9(7):7191–7199. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.021.
270. Matheson LA, Maksym GN, Santerre JP, Labow RS. The functional response of U937 macrophage-like cells is modulated by extracellular matrix proteins and mechanical strain. *Biochem Cell Biol*. 2006;84(5):763–773. doi: 10.1139/o06-093.
271. Zhang Y, Lian F, Zhu Y, et al. Cyanidin-3-O- β -glucoside inhibits LPS-induced expression of inflammatory mediators through decreasing I κ B α phosphorylation in THP-1 cells. *Inflamm Res*. 2010;59(9):723–730. doi: 10.1007/s00011-010-0183-7.
272. Prasad A, Sedlářová M, Balukova A, et al. Reactive Oxygen Species Imaging in U937 Cells. *Front Physiol*. 2020;11:552569. doi: 10.3389/fphys.2020.552569.
273. Tauber S, Paulsen K, Wolf S, et al. Regulation of MMP-9 by a WIN-Binding Site in the Monocyte-Macrophage System Independent from Cannabinoid Receptors. Idzko M, editor. *PLoS ONE*. 2012;7(11):e48272. doi: 10.1371/journal.pone.0048272.
274. Chimal-Ramírez GK, Espinoza-Sánchez NA, Chávez-Sánchez L, Arriaga-Pizano L, Fuentes-Pananá EM. Monocyte Differentiation towards Protumor Activity Does Not Correlate with M1 or M2 Phenotypes. *J Immunol Res*. 2016;2016:1–16. doi: 10.1155/2016/6031486.
275. Yao Y, Xu X-H, Jin L. Macrophage Polarization in Physiological and Pathological Pregnancy. *Front Immunol*. 2019;10:792. doi: 10.3389/fimmu.2019.00792.
276. Pinto SM, Kim H, Subbannayya Y, et al. Comparative Proteomic Analysis Reveals Varying Impact on Immune Responses in Phorbol 12-Myristate-13-Acetate-Mediated THP-1 Monocyte-to-Macrophage Differentiation. *Front Immunol*. 2021;12:679458. doi: 10.3389/fimmu.2021.679458.
277. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):725–734. doi: 10.1038/nri910.
278. Inoue K, Takano H, Shimada A, Satoh M. Metallothionein as an Anti-Inflammatory Mediator. *Mediators Inflamm*. 2009;2009:101659. doi: 10.1155/2009/101659.

279. Dai H, Wang L, Li L, Huang Z, Ye L. Metallothionein 1: A New Spotlight on Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2021;12:739918. doi: 10.3389/fimmu.2021.739918.
280. Ma Y, Du J, Yin Z, et al. Metallothionein-1 is Positively Correlated with Inflammation and Ankylosing Spondylitis Activity. *J Inflamm Res.* 2022;Volume 15:5935–5944. doi: 10.2147/JIR.S382827.
281. Chang Y-W, Wang C-C, Yin C-F, Wu C-H, Huang H-C, Juan H-F. Quantitative phosphoproteomics reveals ectopic ATP synthase on mesenchymal stem cells to promote tumor progression via ERK/c-Fos pathway activation. *Mol Cell Proteomics.* 2022;21(6):100237. doi: 10.1016/j.mcpro.2022.100237.
282. Gavala ML, Pfeiffer ZA, Bertics PJ. The nucleotide receptor P2RX7 mediates ATP-induced CREB activation in human and murine monocytic cells. *J Leukoc Biol.* 2008;84(4):1159–1171. doi: 10.1189/jlb.0907612.
283. Carpenè E, Andreani G, Isani G. Metallothionein functions and structural characteristics. *J Trace Elem Med Biol.* 2007;21:35–39. doi: 10.1016/j.jtemb.2007.09.011.
284. Wu H, Yang K, Zhang Z, et al. Development of Multifunctional Histone Deacetylase 6 Degradors with Potent Antimyeloma Activity. *J Med Chem.* 2019;62(15):7042–7057. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00516.
285. Douglass EF, Miller CJ, Sparer G, Shapiro H, Spiegel DA. A Comprehensive Mathematical Model for Three-Body Binding Equilibria. *J Am Chem Soc.* 2013;135(16):6092–6099. doi: 10.1021/ja311795d.
286. Noman ASM, Koide N, Hassan F, et al. Thalidomide inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production via down-regulation of MyD88 expression. *Innate Immun.* 2009;15(1):33–41. doi: 10.1177/1753425908099317.
287. Depetter Y, Geurs S, De Vreese R, et al. Selective pharmacological inhibitors of HDAC6 reveal biochemical activity but functional tolerance in cancer models: Activity of HDAC6 inhibitors in cancer models. *Int J Cancer.* 2019;145(3):735–747. doi: 10.1002/ijc.32169.
288. Mestas J, Hughes CCW. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J Immunol.* 2004;172(5):2731–2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731.
289. Gaidt MM, Ebert TS, Chauhan D, et al. Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity.* 2016;44(4):833–846. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.012.
290. Munford RS. Murine Responses to Endotoxin: Another Dirty Little Secret? *J Infect Dis.* 2010;201(2):175–177. doi: 10.1086/649558.
291. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26(2):171–176. doi: 10.1002/ijc.2910260208.

292. Lund ME, To J, O'Brien BA, Donnelly S. The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus. *J Immunol Methods*. 2016;430:64–70. doi: 10.1016/j.jim.2016.01.012.
293. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MKB, Dockrell DH. The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. Doherty TM, editor. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8668. doi: 10.1371/journal.pone.0008668.
294. Tedesco S, De Majo F, Kim J, et al. Convenience versus Biological Significance: Are PMA-Differentiated THP-1 Cells a Reliable Substitute for Blood-Derived Macrophages When Studying in Vitro Polarization? *Front Pharmacol*. 2018;9:71. doi: 10.3389/fphar.2018.00071.
295. Taimi M, Defacque H, Commes T, Favero J, Caron E, Marti J. Effect of retinoic acid and vitamin D on the expression of interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and interleukin-6 in the human monocytic cell line U937. *Immunology*. 1993;79(2):229–235.
296. Ghosh CC, Ramaswami S, Juvekar A, et al. Gene-Specific Repression of Proinflammatory Cytokines in Stimulated Human Macrophages by Nuclear I κ B α . *J Immunol*. 2010;185(6):3685–3693. doi: 10.4049/jimmunol.0902230.
297. Sha W, Mitoma H, Hanabuchi S, et al. Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(45):16059–16064. doi: 10.1073/pnas.1412487111.
298. Clark R, Kupper T. Old Meets New: The Interaction Between Innate and Adaptive Immunity. *J Invest Dermatol*. 2005;125(4):629–637. doi: 10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x.
299. Cohen HB, Briggs KT, Marino JP, Ravid K, Robson SC, Mosser DM. TLR stimulation initiates a CD39-based autoregulatory mechanism that limits macrophage inflammatory responses. *Blood*. 2013;122(11):1935–1945. doi: 10.1182/blood-2013-04-496216.
300. Grahames CBA, Michel AD, Chessell IP, Humphrey PPA. Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1 β release in human monocytes. *Br J Pharmacol*. 1999;127(8):1915–1921. doi: 10.1038/sj.bjp.0702732.
301. Ruiz-Ruiz C, Calzaferri F, García AG. P2X₇ Receptor Antagonism as a Potential Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Front Mol Neurosci*. 2020;13:93. doi: 10.3389/fnmol.2020.00093.
302. Calzaferri F, Ruiz-Ruiz C, Diego AMG, et al. The purinergic P2X₇ receptor as a potential drug target to combat neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Med Res Rev*. 2020;40(6):2427–2465. doi: 10.1002/med.21710.
303. Romagnoli R, Baraldi PG, Cruz-Lopez O, et al. The P2X₇ receptor as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(5):647–661. doi: 10.1517/14728222.12.5.647.

304. Mizushina Y, Karasawa T, Aizawa K, et al. Inflammasome-Independent and Atypical Processing of IL-1 β Contributes to Acid Aspiration–Induced Acute Lung Injury. *J Immunol.* 2019;203(1):236–246. doi: 10.4049/jimmunol.1900168.
305. Schaale K, Peters KM, Murthy AM, et al. Strain- and host species-specific inflammasome activation, IL-1 β release, and cell death in macrophages infected with uropathogenic *Escherichia coli*. *Mucosal Immunol.* Nature Publishing Group; 2016;9(1):124–136. doi: 10.1038/mi.2015.44.
306. Barberà-Cremades M, Baroja-Mazo A, Gomez AI, Machado F, Di Virgilio F, Pelegrín P. P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE2 and IL-1 β release. *FASEB J.* 2012;26(7):2951–2962. doi: 10.1096/fj.12-205765.
307. Martín-Sánchez F, Diamond C, Zeitler M, et al. Inflammasome-dependent IL-1 β release depends upon membrane permeabilisation. *Cell Death Differ.* 2016;23(7):1219–1231. doi: 10.1038/cdd.2015.176.
308. Cullen SP, Kearney CJ, Clancy DM, Martin SJ. Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 β Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Rep.* 2015;11(10):1535–1548. doi: 10.1016/j.celrep.2015.05.003.
309. Zeng W, Wu D, Sun Y, et al. The selective NLRP3 inhibitor MCC950 hinders atherosclerosis development by attenuating inflammation and pyroptosis in macrophages. *Sci Rep.* 2021;11(1):19305. doi: 10.1038/s41598-021-98437-3.
310. Heiser D, Rubert J, Unterreiner A, et al. Evaluation of protein kinase D auto-phosphorylation as biomarker for NLRP3 inflammasome activation. Wang QJ, editor. *PLOS ONE.* 2021;16(11):e0248668. doi: 10.1371/journal.pone.0248668.
311. Nie X, Ma B, Yuan X, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Mediated NLRP3 Inflammasome Activation and Pyroptosis in THP-1 Macrophages Infected with *Bacillus Calmette-Guérin*. *Int J Mol Sci.* 2023;24(14):11692. doi: 10.3390/ijms241411692.
312. Wee H-N, Neo S-Y, Singh D, et al. Effects of *Vitex trifolia* L. leaf extracts and phytoconstituents on cytokine production in human U937 macrophages. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20(1):91. doi: 10.1186/s12906-020-02884-w.
313. Colomar A, Marty V, Médina C, Combe C, Parnet P, Amédée T. Maturation and Release of Interleukin-1 β by Lipopolysaccharide-primed Mouse Schwann Cells Require the Stimulation of P2X7 Receptors. *J Biol Chem.* 2003;278(33):30732–30740. doi: 10.1074/jbc.M304534200.
314. Groß CJ, Mishra R, Schneider KS, et al. K⁺ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity.* 2016;45(4):761–773. doi: 10.1016/j.immuni.2016.08.010.

315. Perregaux D, Gabel CA. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem*. 1994;269(21):15195–15203. doi: 10.1016/S0021-9258(17)36591-2.
316. Zhang C, Qin J, Zhang S, et al. ADP/P2Y1 aggravates inflammatory bowel disease through ERK5-mediated NLRP3 inflammasome activation. *Mucosal Immunol*. 2020;13(6):931–945. doi: 10.1038/s41385-020-0307-5.
317. Di Virgilio F. Novel data point to a broader mechanism of action of oxidized ATP: the P2X₇ receptor is not the only target: Commentary. *Br J Pharmacol*. 2003;140(3):441–443. doi: 10.1038/sj.bjp.0705469.
318. Savio LEB, De Andrade Mello P, Da Silva CG, Coutinho-Silva R. The P2X₇ Receptor in Inflammatory Diseases: Angel or Demon? *Front Pharmacol*. 2018;9:52. doi: 10.3389/fphar.2018.00052.
319. Beigi RD, Kertesz SB, Aquilina G, Dubyak GR. Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling *via* P2 receptor-independent mechanisms: P2 receptor-independent actions of oATP. *Br J Pharmacol*. 2003;140(3):507–519. doi: 10.1038/sj.bjp.0705470.
320. Sakaki H, Fujiwaki T, Tsukimoto M, Kawano A, Harada H, Kojima S. P2X₄ receptor regulates P2X₇ receptor-dependent IL-1 β and IL-18 release in mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(3):406–411. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.135.
321. Hung S-C, Choi CH, Said-Sadier N, et al. P2X₄ Assembles with P2X₇ and Pannexin-1 in Gingival Epithelial Cells and Modulates ATP-induced Reactive Oxygen Species Production and Inflammasome Activation. Jiang S, editor. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e70210. doi: 10.1371/journal.pone.0070210.
322. Riteau N, Baron L, Villeret B, et al. ATP release and purinergic signaling: a common pathway for particle-mediated inflammasome activation. *Cell Death Dis*. 2012;3(10):e403–e403. doi: 10.1038/cddis.2012.144.
323. Human Protein Atlas. Subcellular - P2RX1 Expression. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000108405-P2RX1/subcellular>. Accessed August 14, 2023.
324. The Human Protein Atlas. Subcellular - P2RX4 Expression. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135124-P2RX4/subcellular>. Accessed August 14, 2023.
325. Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science*. 2017;356(6340):eaal3321. doi: 10.1126/science.aal3321.

-
326. Nagai J, Lin J, Boyce JA. Macrophage P2Y6 Receptor Signaling Selectively Activates NFATC2 and Suppresses Allergic Lung Inflammation. *J Immunol.* 2022;209(12):2293–2303. doi: 10.4049/jimmunol.2200452.
327. Erb L, Weisman GA. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 2012;1(6):789–803. doi: 10.1002/wmts.62.
328. Piyasirananda W, Beekman A, Ganesan A, Bidula S, Stokes L. Insights into the Structure-Activity Relationship of Glycosides as Positive Allosteric Modulators Acting on P2X7 Receptors. *Mol Pharmacol.* 2021;99(2):163–174. doi: 10.1124/molpharm.120.000129.
329. Ase AR, Honson NS, Zaghdane H, Pfeifer TA, Séguéla P. Identification and Characterization of a Selective Allosteric Antagonist of Human P2X4 Receptor Channels. *Mol Pharmacol.* 2015;87(4):606–616. doi: 10.1124/mol.114.096222.
330. Fagerberg SK, Jakobsen MR, Skals M, Praetorius HA. Inhibition of P2X Receptors Protects Human Monocytes against Damage by Leukotoxin from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and α -Hemolysin from *Escherichia coli*. Blanke SR, editor. *Infect Immun.* 2016;84(11):3114–3130. doi: 10.1128/IAI.00674-16.
331. Layhadi JA, Fountain SJ. ATP-Evoked Intracellular Ca^{2+} Responses in M-CSF Differentiated Human Monocyte-Derived Macrophage are Mediated by P2X4 and P2Y11 Receptor Activation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20):5113. doi: 10.3390/ijms20205113.
332. Adinolfi E, Callegari MG, Ferrari D, et al. Basal Activation of the P2X₇ ATP Receptor Elevates Mitochondrial Calcium and Potential, Increases Cellular ATP Levels, and Promotes Serum-independent Growth. *Mol Biol Cell.* 2005;16(7):3260–3272. doi: 10.1091/mbc.e04-11-1025.
333. Adamczyk M, Griffiths R, Dewitt S, Knäuper V, Aeschlimann D. P2X7 receptor activation regulates rapid unconventional export of transglutaminase-2. *J Cell Sci.* 2015;128(24):4615–4628. doi: 10.1242/jcs.175968.
334. Jiang L-H, Caseley EA, Muench SP, Roger S. Structural basis for the functional properties of the P2X7 receptor for extracellular ATP. *Purinergic Signal.* 2021;17(3):331–344. doi: 10.1007/s11302-021-09790-x.
335. Rajarathnam K, Rösigen J. Isothermal titration calorimetry of membrane proteins — Progress and challenges. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1838(1):69–77. doi: 10.1016/j.bbamem.2013.05.023.
336. Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP. Radioligand Binding Assays and Their Analysis. In: Davenport AP, editor. *Recept Bind Tech.* Totowa (US): Humana Press; 2012. p. 31–77. doi: 10.1007/978-1-61779-909-9_3.

337. Jin H, Han J, Resing D, et al. Synthesis and in vitro characterization of a P2X7 radioligand [123I]TZ6019 and its response to neuroinflammation in a mouse model of Alzheimer disease. *Eur J Pharmacol.* 2018;820:8–17. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.12.006.
338. Gombault A, Baron L, Couillin I. ATP release and purinergic signaling in NLRP3 inflammasome activation. *Front Immunol.* 2013;3:414. doi: 10.3389/fimmu.2012.00414.
339. Baron L, Gombault A, Fanny M, et al. The NLRP3 inflammasome is activated by nanoparticles through ATP, ADP and adenosine. *Cell Death Dis.* 2015;6(2):e1629–e1629. doi: 10.1038/cddis.2014.576.
340. Shamaa OR, Mitra S, Gavrilin MA, Wewers MD. Monocyte Caspase-1 Is Released in a Stable, Active High Molecular Weight Complex Distinct from the Unstable Cell Lysate-Activated Caspase-1. Allen IC, editor. *PLOS ONE.* 2015;10(11):e0142203. doi: 10.1371/journal.pone.0142203.
341. Wewers MD, Dare HA, Winnard AV, Parker JM, Miller DK. IL-1 β -converting enzyme (ICE) is present and functional in human alveolar macrophages: macrophage IL-1 β release limitation is ICE independent. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1997;159(12):5964–5972.
342. Ayala JM, Yamin TT, Egger LA, Chin J, Kostura MJ, Miller DK. IL-1 beta-converting enzyme is present in monocytic cells as an inactive 45-kDa precursor. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1994;153(6):2592–2599.
343. Jakobs C, Bartok E, Kubarenko A, Bauernfeind F, Hornung V. Immunoblotting for Active Caspase-1. In: De Nardo CM, Latz E, editors. *The Inflammasome.* Totowa (US): Humana Press; 2013. p. 103–115. doi: 10.1007/978-1-62703-523-1_9.
344. Guo H, Ting JP -Y. Inflammasome Assays In Vitro and in Mouse Models. *Curr Protoc Immunol.* 2020;131(1):e107. doi: 10.1002/cpim.107.
345. Grabarek J, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Use of Fluorescently Labeled Caspase Inhibitors as Affinity Labels to Detect Activated Caspases. *Hum Cell.* 2002;15(1):1–12. doi: 10.1111/j.1749-0774.2002.tb00094.x.
346. Hussen J, Düvel A, Koy M, Schuberth H-J. Inflammasome activation in bovine monocytes by extracellular ATP does not require the purinergic receptor P2X7. *Dev Comp Immunol.* 2012;38(2):312–320. doi: 10.1016/j.dci.2012.06.004.
347. Amstad PA, Yu G, Johnson GL, Lee BW, Dhawan S, Phelps DJ. Detection of Caspase Activation In Situ by Fluorochrome-Labeled Caspase Inhibitors. *BioTechniques.* 2001;31(3):608–616. doi: 10.2144/01313pf01.
348. O'Brien M, Moehring D, Muñoz-Planillo R, et al. A bioluminescent caspase-1 activity assay rapidly monitors inflammasome activation in cells. *J Immunol Methods.* 2017;447:1–13. doi: 10.1016/j.jim.2017.03.004.

349. Afonina IS, Müller C, Martin SJ, Beyaert R. Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*. 2015;42(6):991–1004. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.003.
350. Kahlenberg JM, Dubyak GR. Mechanisms of caspase-1 activation by P2X₇ receptor-mediated K⁺ release. *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2004;286(5):C1100–C1108. doi: 10.1152/ajpcell.00494.2003.
351. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, et al. Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997;159(3):1451–1458.
352. Netea MG, Simon A, Van De Veerdonk F, Kullberg B-J, Van Der Meer JWM, Joosten LAB. IL-1 β Processing in Host Defense: Beyond the Inflammasomes. Manchester M, editor. *PLoS Pathog*. 2010;6(2):e1000661. doi: 10.1371/journal.ppat.1000661.
353. Lukens JR, Gross JM, Calabrese C, et al. Critical role for inflammasome-independent IL-1 β production in osteomyelitis. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;111(3):1066–1071. doi: 10.1073/pnas.1318688111.
354. Mayer-Barber KD, Barber DL, Shenderov K, et al. Cutting Edge: Caspase-1 Independent IL-1 β Production Is Critical for Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and Does Not Require TLR Signaling In Vivo. *J Immunol*. 2010;184(7):3326–3330. doi: 10.4049/jimmunol.0904189.
355. Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, et al. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1 β from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;(11):6261–6266. doi: 10.1073/pnas.96.11.6261.
356. Xing Y, Yao X, Li H, et al. Cutting Edge: TRAF6 Mediates TLR/IL-1R Signaling–Induced Nontranscriptional Priming of the NLRP3 Inflammasome. *J Immunol*. 2017;199(5):1561–1566. doi: 10.4049/jimmunol.1700175.
357. Farhat K, Riekenberg S, Heine H, et al. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):692–701. doi: 10.1189/jlb.0807586.
358. Choi HB, Ryu JK, Kim SU, McLarnon JG. Modulation of the Purinergic P2X₇ Receptor Attenuates Lipopolysaccharide-Mediated Microglial Activation and Neuronal Damage in Inflamed Brain. *J Neurosci*. 2007;27(18):4957–4968. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5417-06.2007.
359. Penkowa M, Carrasco J, Giralt M, et al. Altered Central Nervous System Cytokine-Growth Factor Expression Profiles and Angiogenesis in Metallothionein-I+II Deficient Mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(8):1174–1189. doi: 10.1097/00004647-200008000-00003.

360. De SK, McMaster MT, Andrews GK. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J Biol Chem*. 1990;265(25):15267–15274. doi: 10.1016/S0021-9258(18)77251-7.
361. Krężel A, Maret W. The Functions of Metamorphic Metallothioneins in Zinc and Copper Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1237. doi: 10.3390/ijms18061237.
362. Haase H, Overbeck S, Rink L. Zinc supplementation for the treatment or prevention of disease: Current status and future perspectives. *Exp Gerontol*. 2008;43(5):394–408. doi: 10.1016/j.exger.2007.12.002.
363. Prasad AS, Bao B, Beck FWJ, Kucuk O, Sarkar FH. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic Biol Med*. 2004;37(8):1182–1190. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.007.
364. Bao B, Prasad AS, Beck FWJ, et al. Zinc supplementation decreases oxidative stress, incidence of infection, and generation of inflammatory cytokines in sickle cell disease patients. *Transl Res*. 2008;152(2):67–80. doi: 10.1016/j.trsl.2008.06.001.
365. George MM, Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Caruso JA, Deepe GS. Zinc Induces Dendritic Cell Tolerogenic Phenotype and Skews Regulatory T Cell–Th17 Balance. *J Immunol*. 2016;197(5):1864–1876. doi: 10.4049/jimmunol.1600410.
366. Wessels I, Haase H, Engelhardt G, Rink L, Uciechowski P. Zinc deficiency induces production of the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF α in promyeloid cells via epigenetic and redox-dependent mechanisms. *J Nutr Biochem*. 2013;24(1):289–297. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.06.007.
367. Summersgill H, England H, Lopez-Castejon G, et al. Zinc depletion regulates the processing and secretion of IL-1 β . *Cell Death Dis*. 2014;5(1):e1040–e1040. doi: 10.1038/cddis.2013.547.
368. Brough D, Pelegrin P, Rothwell NJ. Pannexin-1-dependent caspase-1 activation and secretion of IL-1 β is regulated by zinc. *Eur J Immunol*. 2009;39(2):352–358. doi: 10.1002/eji.200838843.
369. Barbato JC, Catanescu O, Murray K, DiBello PM, Jacobsen DW. Targeting of Metallothionein by L-Homocysteine: A Novel Mechanism for Disruption of Zinc and Redox Homeostasis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(1):49–54. doi: 10.1161/01.ATV.0000251536.49581.8a.
370. Cao J, Bobo JA, Liuzzi JP, Cousins RJ. Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis. *J Leukoc Biol*. 2001;70(4):559–566. doi: 10.1189/jlb.70.4.559.
371. Liu Z, Hu M, Yang Y, et al. An overview of PROTACs: a promising drug discovery paradigm. *Mol Biomed*. 2022;3(1):46. doi: 10.1186/s43556-022-00112-0.
372. Gao H, Sun X, Rao Y. PROTAC Technology: Opportunities and Challenges. *ACS Med Chem Lett*. 2020;11(3):237–240. doi: 10.1021/acsmchemlett.9b00597.

373. Moreau K, Coen M, Zhang AX, et al. Proteolysis-targeting chimeras in drug development: A safety perspective. *Br J Pharmacol*. 2020;177(8):1709–1718. doi: 10.1111/bph.15014.
374. Liu J-R, Yu C-W, Hung P-Y, Hsin L-W, Chern J-W. High-selective HDAC6 inhibitor promotes HDAC6 degradation following autophagy modulation and enhanced antitumor immunity in glioblastoma. *Biochem Pharmacol*. 2019;163:458–471. doi: 10.1016/j.bcp.2019.03.023.
375. Němec V, Schwalm MP, Müller S, Knapp S. PROTAC degraders as chemical probes for studying target biology and target validation. *Chem Soc Rev*. 2022;51(18):7971–7993. doi: 10.1039/D2CS00478J.
376. Chen Q, Wang Y, Jiao F, et al. HDAC 6 inhibitor ACY 1215 inhibits the activation of NLRP 3 inflammasome in acute liver failure by regulating the ATM/F-actin signalling pathway. *J Cell Mol Med*. 2021;25(15):7218–7228. doi: 10.1111/jcmm.16751.
377. Yan S, Wei X, Jian W, et al. Pharmacological Inhibition of HDAC6 Attenuates NLRP3 Inflammatory Response and Protects Dopaminergic Neurons in Experimental Models of Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*. 2020;12:78. doi: 10.3389/fnagi.2020.00078.
378. Xu S, Chen H, Ni H, Dai Q. Targeting HDAC6 attenuates nicotine-induced macrophage pyroptosis via NF- κ B/NLRP3 pathway. *Atherosclerosis*. 2021;317:1–9. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2020.11.021.
379. Pellegrini C, Antonioli L, Lopez-Castejon G, Blandizzi C, Fornai M. Canonical and Non-Canonical Activation of NLRP3 Inflammasome at the Crossroad between Immune Tolerance and Intestinal Inflammation. *Front Immunol*. 2017;8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00036.
380. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2(1):17023. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
381. Kiernan R, Brès V, Ng RWM, et al. Post-activation Turn-off of NF- κ B-dependent Transcription Is Regulated by Acetylation of p65. *J Biol Chem*. 2003;278(4):2758–2766. doi: 10.1074/jbc.M209572200.
382. Yang Q, Li S, Zhou Z, et al. HDAC6 inhibitor Cay10603 inhibits high glucose-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in retinal pigment epithelial cells via regulating NF- κ B and NLRP3 inflammasome pathway. *Gen Physiol Biophys*. 2020;39(02):169–177. doi: 10.4149/gpb_2019058.
383. Yan B, Xie S, Liu Z, et al. HDAC6 Deacetylase Activity Is Critical for Lipopolysaccharide-Induced Activation of Macrophages. Ryffel B, editor. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e110718. doi: 10.1371/journal.pone.0110718.
384. Liu L, Zhou X, Shetty S, Hou G, Wang Q, Fu J. HDAC6 inhibition blocks inflammatory signaling and caspase-1 activation in LPS-induced acute lung injury. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2019;370:178–183. doi: 10.1016/j.taap.2019.03.017.

385. Youn GS, Lee KW, Choi SY, Park J. Overexpression of HDAC6 induces pro-inflammatory responses by regulating ROS-MAPK-NF- κ B/AP-1 signaling pathways in macrophages. *Free Radic Biol Med.* 2016;97:14–23. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.05.014.
386. Deguine J, Barton GM. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep.* 2014;6. doi: 10.12703/P6-97.
387. Millrine D, Miyata H, Tei M, et al. Immunomodulatory drugs inhibit TLR4-induced type-1 interferon production independently of Cereblon *via* suppression of the TRIF/IRF3 pathway. *Int Immunol.* 2016;28(6):307–315. doi: 10.1093/intimm/dxw005.

7. Auflistung der Veröffentlichungen und Förderungen

7.1 Originalarbeiten

Judith Bockstiegel, Jonas Engelhardt, Günther Weindl. P2X7 receptor activation leads to NLRP3-independent IL-1 β release by human macrophages. *Cell Commun Signal*. Akzeptiert. doi: 10.1186/s12964-023-01356-1.

Judith Bockstiegel, Silas L. Wurnig, Jonas Engelhardt, Jana Enns, Finn K. Hansen, Günther Weindl. Pharmacological inhibition of HDAC6 suppresses NLRP3 inflammasome-mediated IL-1 β release. *Biochem Pharmacol*. 2023; 215:115693. doi: 10.1016/j.bcp.2023.115693

Charlotte Lübow, **Judith Bockstiegel**, Günther Weindl. Lysosomotropic drugs enhance pro-inflammatory responses to IL-1 β in macrophages by inhibiting internalization of the IL-1 receptor. *Biochem Pharmacol*. 2020;175:113864. doi: 10.1016/j.bcp.2020.113864

7.2 Manuskripte in Vorbereitung

Judith Bockstiegel, Günther Weindl. The vasoconstrictor adenosine 5'-tetraphosphate induces NLRP3-independent IL-1 β release.

7.3 Vorträge

Judith Bockstiegel, Günther Weindl (2022) *The vasoconstrictor adenosine tetraphosphate induces NLRP3 inflammasome-independent IL-1 β release*. 7th German Pharm-Tox Summit, Deutschland (online), 07. – 10.03.2022

Judith Bockstiegel, Günther Weindl (2021) *The vasoconstrictor adenosine tetraphosphate activates NLRP3 inflammasome*. 6th German Pharm-Tox Summit, Deutschland (online), 01. – 03.03.2021

7.4 Posterbeiträge

Judith Bockstiegel, Günther Weindl (2022), *The vasoconstrictor adenosine tetraphosphate induces IL-1 β release independent from NLRP3 inflammasome and caspase-1 in macrophages*. DPhG Annual Meeting, Marburg, Deutschland, 13. – 16.09.2022

Judith Bockstiegel, Günther Weindl (2019) *β -Glucan training differentially induces trained innate immunity and tolerance in primary monocytes and THP-1-derived macrophages*. Novel Concepts in Innate Immunity, Tübingen, Deutschland, 12. – 17.09.2019

Judith Bockstiegel, Günther Weindl (2019) *β -Glucan training differentially induces trained innate immunity and tolerance in primary monocytes and THP-1-derived macrophages*. 4th German Pharm-Tox Summit, Stuttgart, Deutschland, 25. – 28.02.2019

7.5 Stipendien und Förderungen

Reisestipendium der Frauenförderung des Fachbereichs Biologie, Chemie und Pharmazie der FU Berlin für die Teilnahme an der 4th German Pharm-Tox Summit, Stuttgart, Deutschland, 25. – 28.02.2019

BiGS Drugs der für die Teilnahme an der Novel Concepts in Innate Immunity, Tübingen, Deutschland, 12. – 17.09.2019 und der 6th German Pharm-Tox Summit, Deutschland (online), 01. – 03.03.2021